

Aus dem Institut für Pathologie der Universität Hamburg

(Direktor: Prof. Dr. med. U. Helmchen)

**MULTIDRUG-RESISTANCE BEI KINDLICHEN TUMOREN:
Zellkulturassay, zellulärer Transportmechanismus, Dexniguldipin als Modulator,
klinischer Krankheitsverlauf**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von
Klaus Kogelmann
aus Hannover

Hamburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 17.02.2004

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg.

Dekan: Prof. Dr. R.A.K.. Stahl

Referent: Prof. Dr. H. Arps

Koreferent: Prof. Dr. R. Erttmann

0	Inhaltsverzeichnis	Seite
	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Einleitung	5
2.	Material und Methoden	10
2.1	Zelllinien	10
2.2	Sensitivitätstestung	14
2.3	Zytostatika	17
2.4	Antracyclintransportmessung	19
2.5	Immunhistochemische Untersuchungen	24
2.6	Klinischer Krankheitsverlauf	25
3.	Ergebnisse	28
3.1	Zelllinien	29
3.2	Fallorientierte Ergebnisdarstellung	34
3.2.1	Nephroblastom D 88/154	34
3.2.2	konnatales mesoblastisches Nephrom D 88/210	36
3.2.3	Neuroblastom D 89/177	39
3.2.4	Nephroblastom A 90/192	42
3.2.5	Neuroblastom A 91/014	44
3.2.6	Nephroblastom A 91/041	46
3.2.7	Neuroblastom A 91/049	49
3.2.8	Teratom A 91/060	51
3.2.9	Neuroblastom A 92/005	54
3.2.10	Neuroblastom A 92/037	57
3.2.11	Neuroblastom A 92/041	60
3.3	Referenzlinien	63
3.3.1	F 4/6	65
3.3.2	ADM2 ^R / 0.5	65
3.3.3	ADM2 ^R / 1.0	65
4.	Diskussion	75
5.	Zusammenfassung	88
6.	Literaturverzeichnis	91
7.	Danksagung	104

Abkürzungsverzeichnis

ADR	Doxorubicin
ADM2 ^R	resistenter Klon der Friend Leukemic Cells
CDDP	Cisplatin
CR	complete remission
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNIG	Dexniguldipin
DNR	Daunorubicin
DPM	Zerfallsrate pro Minute
F4-6	sensitiver Klon der Friend Leukemic Cells
LRP	Lung Resistance Protein
MBN	mesoblastisches Nephrom
MDR	Multi Drug Resistance
MR	minimal response
MRP	Multidrug Resistance Protein
MTX	Methotrexat
NBL	Neuroblastom
NC	no change
NOV	Novantron
PGP	P-Glycoprotein
PD	progressive disease
PR	partial remission
TCA	Trichloressigsäure
TER	Teratom
VCR	Vincristin
WT	Wilmstumor

1. Einleitung

Die jährliche Inzidenz maligner Erkrankungen bis zum 15. Lebensjahr beträgt in den industrialisierten Ländern z. Zt. ca. 10 - 15 Erkrankungen auf 100.000 Lebendgeborene. Zu ungefähr 60 % sind diese Erkrankungen bei rechtzeitigem Erkennen und Eingreifen potentiell heilbar. Eine herausragende Rolle in dieser Therapie spielt die moderne Chemotherapie. Heutzutage werden in den meisten Behandlungsprotokollen Kombinationstherapien von verschiedenen Zytostatika appliziert, mit dem Ziel, bei Potenzierung der cytostatischen Wirkung die Nebenwirkungen zu minimieren. Neben den im Kindesalter häufigsten Malignomen (Leukämien, ZNS-Tumoren, Lymphome) folgen bereits an 4. Stelle die Gruppe der Neuroblastome und Nephroblastome mit ca. 6,5 - 7 % der Erkrankungen. Mit diesen beiden embryonalen Tumorarten beschäftigt sich die vorliegende Arbeit.

Bei Wilmstumoren handelt es sich um ein meist einseitig im 1. bis 5. Lebensjahr auftretendes, hochmalignes Nephroblastom, welches oft mit verschiedenen Mißbildungen kombiniert ist (Urogenitalmißbildungen, Aniridie).

Ausgiebige genetische Forschung beschäftigt sich mit Schädigungen auf dem Chromosom 11 im Zusammenhang mit Wilmstumoren (Mattern und Volm 1989, Gutjahr et al. 1990).

Das gutartige kongenitale mesoblastische Nephrom läßt sich nur histologisch abgrenzen. Als Symptome treten auf: Großer Bauchtumor, gestörtes Allgemeinbefinden, Fieber, Aszites, Hämaturie. Die Diagnose wird u.a. durch i.v.-Pyelographie, Sonographie und Computertomographie gestellt.

Tabelle 1

Stadieneinteilung und Heilungschancen bei Wilmstumor

Stadium	Tumorausbreitung	Heilungschancen
I	Intrarenal, einseitig	bis zu 95%
II	Intra- und Extrakapsulär	
III	Intraabdominelle Aussaat	
IV	Metastasierung	bis zu 60%
V	Bilateraler Tumor	

Quelle: Niessen K, (1989)

Neben Radiatio und Operation wird hierbei u.a. ein Chemotherapieprotokoll mit folgenden Zytostatika verwendet: Cisplatin (CDDP), Vincristin (VCR), Doxorubicin (ADR), Actinomycin D (ACD), Aclarubicin.

Das Neuroblastom besteht aus embryonalem sympathischem Nervengewebe, welches auch innerhalb eines Tumors sehr unterschiedliche Differenzierungsgrade aufweist (Grading nach Hughes). Der Altersgipfel liegt zwischen 2. und 4. Lebensjahr. Das klinische Bild wird vor allem durch die Tumorlokalisation und das verdrängende Wachstum bestimmt, zu 60% tritt das Neuroblastom abdominell paravertebral auf. Hierbei treten diffuse Abdominalbeschwerden auf, wie z.B. Schmerzen, Erbrechen, Durchfall und Obstipation neben Fieber, Anämie, Gewichtsverlust und neurologischen Ausfällen, wie z.B. Horner-Syndrom. Die Diagnose erfolgt durch Computertomographie, konventionelles Röntgen, sowie Laborwerte, wie u.a. die Neuronenspezifische Enolase, Ferritin und eine erhöhte Katecholaminproduktion (meßbar im 24-h Urin). Letzteres bildet die Grundlage neuester Screeninguntersuchungen in den Vorsorgeuntersuchungen bis zum 6. Lebensjahr.

Tabelle 2

Stadien und Heilungschancen bei Neuroblastomen (Stadieneinteilung nach Evans):

Stadium	Tumorausbreitung	Heilungschancen
I	auf den Ursprungsort begrenzt	bis zu 80%
II	einseitig lokal mit Infiltrationen	
III	Überschreiten der Mittellinie	
IV	Disseminiert	bis zu 20%
IV-S (bei Säuglingen)	in bestimmte Organe metastasiert (Haut, Knochenmark, Leber)	bis zu 70%

Quelle: Niessen K, (1989)

Auch bei Neuroblastomen wird neben der primär angestrebten Resektion und adjuvanter Radiatio ein Chemotherapieprotokoll (NB 90) mit CDDP, Vindesin, VP 16, VCR, DTIC, Ifosamid, ADR verwendet.

Das große Problem der heutigen Zeit in der Chemotherapie sind Resistenzen gegen Zytostatika. Hierbei beschreibt der Terminus Multi-Drug-Resistance eine Form der Kreuzresistenz von Tumorzellen gegen Antracycline, Antibiotika und Alkaloide. Dieses Phänomen beobachteten erstmals in den 60`er Jahren Kessel und Mitarbeiter (1968) an P 388 Leukämiezellen. 1976 beschrieb eine Arbeitsgruppe um V. Ling das gleiche Resistenzverhalten bei CHO-Zellen (Ovarzellen Chinesischer Hamster), und isolierte ein 170 KD großes Glycoprotein, welches bei den resistenten Zellen gegenüber den sensitiven Ursprungszellen überexprimiert war (Juliano,RL. und Ling,V. 1976). Dieses P-Glycoprotein genannte Membranprotein ist eine der Grundlagen für die Multi-Drug-Resistance und ist seither Gegenstand vieler Untersuchungen. Das P-Glycoprotein (PGP) steigert per aktivem Transport den Zytostatikaefflux aus der Zelle (Mattern und Volm 1989, Bellamy et al. 1990, Akiyama et al. 1999, Ferry et al. 2000). Physiologische Funktion dieses Proteins dürfte wohl z.B. die Exkretion von Karzinogenen, Steroiden und ähnlichen Substanzen sein (Wolf et al. 1992, Lum et al. 1993). Es existieren Homologien zu bakteriellen Transportproteinen und bakterieller Resistenz, z.B. Colchicinresistenz bei Plasmodium falciparum (Endicott und Ling 1989, Friche et al. 1989, Karcz und Cowman 1991). PGP kommt in vielen normalen Körpergeweben vor: In hohen Konzentrationen z.B. in Nebenniere, Niere, Kolon, Pancreas und Lunge. In niedrigen Konzentrationen im Ösophagus, Hirngefäßen, Lymphknoten und Testes (Dietel,M. 1991, Lum et al. 1993).

Tumoren mit einer intrinsischen MDR-Resistenz sind u.a. Wilmstumoren, eine erworbene MDR-Resistenz beobachtet man z.B. bei Neuroblastomen (Lum et al. 1993). Medikamente, die mit MDR assoziiert sind, sind z.B. Vincristin, Daunorubicin und Adriblastin. Mit der MDR-Resistenz üblicherweise nicht vergesellschaftet sind u.a. Methotrexat und Cisplatin (Mattern, Volm 1989).

Beschrieben werden auch Fälle, die klinisch mit einer Multi-Drug-Resistance einhergehen, denen aber eine PGP-Überexpression fehlt. Dieses Phänomen wurde "atypische MDR" genannt. (Dietel et al. 1990, Yokomizo et al. 1994). Hierbei können verschiedene Membranproteine eine Rolle spielen (Barrand et al. 1993, Bellamy et al. 1990, Meyers et al. 1989, ua.). Mit MDR assoziierte Membranproteine sind das Multi-Drug-Resistance Protein (MRP) sowie das Lung-Resistance-Protein (LRP), welche in letzter Zeit Gegenstand der Untersuchungen sind (Broxtermann et al. 1997, Laurencot et al. 1997, Stein et al. 1997, Boutonnat et al. 1998, Akiyama et al. 1999, Yokoyama et al. 1999, Michieli et al. 1999 und 2000, Ross 2000, Lehne et al. 2000).

Im Rahmen der Chemotherapie spielt die Multi Drug Resistance eine große Rolle. Von großer Bedeutung wäre es, ein System zur Prädiktion der Wirkung verschiedener Medikamente, ähnlich einem Antibiogramm, mit der Möglichkeit zu kombinieren, PGP positive Tumorzellen bereits initial mit entsprechenden Modulatoren zu behandeln. Eine Voraussetzung für die Applikation von diesen Modulatoren wäre prätherapeutisch eine exakte Klassifizierung der Tumorzellen, die nicht zu zeitaufwendig sein darf. Hierzu könnten die benutzten Verfahren dienen.

Es wurde untersucht, inwieweit bei resistenten Tumoren eine PGP-vermittelte MDR vorlag, und ob diese mit Hilfe von Dexniguldipin als Modulator reversibel war. Zusätzlich wurde die direkte antiproliferative Wirkung des Dexniguldipin überprüft. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde eine Zelllinie bekannter Resistenz zusammen mit ihrer sensitiven Stammlinie vergleichend mituntersucht. Hierbei handelt es sich um die Zelllinie F4-6, eine Erythroleukämiezelle, mit ihrem ADR-resistenten Subklon ADM2^R, der in zwei unterschiedlichen Resistenzstufen vorlag.

Schon 1981 beobachteten Tsuruo et al. daß MDR in Leukämiezellen durch den Calciumantagonisten Verapamil reversibel war. Seither ist eine Vielzahl Substanzen untersucht worden, bei denen eine MDR-Modulation diskutiert wird: sogenannte Chemosensitizer (z.B. Cyclosporin A, Calmodulininhibitoren und Calciumantagonisten), spezifische PGP-Antikörper und auch natürliche Substanzen wie z.B. Rosmarinextrakt (Plouzek et al. 1999). Oft treten aber Probleme bei der substanz eigenen Toxizität auf. Cyclosporin wirkt z.B. nephrotoxisch, Verapamil induziert EKG-Veränderungen bis zum AV Block und verstärkt die Cardiotoxizität von Doxorubicin (Akimoto et al. 1993). EKG-Veränderungen, cardiale Symptome und auch zentralnervöse Symptome werden auch für Dexniguldipin beschrieben (Nuessler et al. 1997).

Der Wirkmechanismus ist bei vielen Substanzen noch nicht völlig geklärt, u.a. spielen P-Glycoprotein-Inhibitoren (Verapamil), Gluthathion-S-Transferase-Inhibitoren (Ethacrynsäure), Protein-C-Kinase-Hemmer (Staurosporin) und Immunsuppressoren (Cyclosporin, Dexamethason) eine Rolle. Das Dihydropyridinderivat Dexniguldipin (B859-835, bzw. DNIG) wirkt als P-Glycoprotein-Inhibitor kompetitiv hemmend und wohl 10-fach potenter als Verapamil (Hoffmann et al. 1992) Es besitzt dabei eine wesentlich geringere systemische Toxizität (Belz et al. 1992, Hofmann et al. 1992, Karck et al. 1992, Reymann et al. 1993), so daß es hypothetisch in der Klinik in

suffizienter Dosierung eingesetzt werden könnte. Zusätzlich wird für DNIG eine direkte antiproliferative Wirkung beschrieben (Schuller et al. 1994).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der von Dietel und Arps entwickelte Monolayerproliferationsassay benutzt (Dietel 1990). Dieser Zellkultur-Proliferationsassay erlaubt eine Aussage über Resistenz oder Sensibilität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika mit der Besonderheit, daß die tumorzeleigene Wachstumskinetik in seiner Auswertung berücksichtigt wird. Im Zusammenhang mit dem klinischen Krankheitsverlauf der Patienten können Aussagen darüber getroffen werden, inwiefern bestimmte Medikamente wahrscheinlich erfolgreich bzw. wahrscheinlich nicht erfolgreich eingesetzt werden können und damit von vorneherein in der Therapie einzusetzen oder zu vermeiden wären. Es kann die Korrelation zwischen eingesetzten Medikamenten und dem Verlauf der Erkrankung mit dem im Assay erhaltenen Ergebnis überprüft werden.

Mit Hilfe immunhistologischer Methodik werden die Tumorzellen bezüglich ihres PGP-Status charakterisiert. Benutzt wird dazu die Färbung nach APAAP mit den Antikörpern MRK 16, JSB 1 und C 219, die jeweils das P-Glycoprotein detektieren.

Mit einer Silikonölfiltrationsmethode wurde der zelluläre Transport der untersuchten Zytostatika dargestellt. Hierbei kann das Verhalten der Substanzen in den einzelnen Zellkompartimenten in ausreichend kurzer Zeit und weitgehend ohne unphysiologische Zwischenschritte in der Präparation untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Zellkulturen aus 11 Primärtumoren wurden aus zuvor aufbereitetem Gewebematerial rekultiviert. Es handelt sich hierbei um unterschiedliche embryonale Tumoren (siehe Tab.2.1). Die Gewebeproben, aus denen die Zellkulturen stammen, wurden ursprünglich von der Universitäts-Kinderklinik konsiliarisch zur Chemosensitivitätstestung im Monolayer-Proliferationsassay an das Institut für Pathologie der Universität Hamburg weitergeleitet. Es handelte sich hierbei um OP-Präparate oder Probeexzisionen. Nach der 1. Testung im Proliferationsassay wurden die angezüchteten Zellen tiefgefroren. Zur Durchführung der Versuche wurden die Tumorzellen rekultiviert.

Als Referenzlinie in den Versuchen diente eine Friend-Virus transformierte Erythroleukämiezelle der Maus. Nach Virusinduktion des Mäusestammes DBA/2 gelang 1966 die permanente Kultivierung dieser Leukämiezelle durch C. Friend, Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York (Friend et al. 1966). In der Literatur werden diese Zellen üblicherweise als "Friend Leukemic Cells" bzw. "F4-6" bezeichnet. Diese wurden ursprünglich von Prof. Dr. W. Ostertag, Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg, Abteilung für Allgemeine Toxikologie, zur Verfügung gestellt. Dort wurde von Dr. A. Schaefer der Subklon F4-6 ADM2^R selektioniert, der gegenüber dem F 4-6 Stammklon eine 200-fache Resistenz gegen Doxorubicin aufweist. Kultiviert wurde dieser Subklon bei Konzentrationen von 1,0 und 0,5 µg/ml Doxorubicin (Schaefer et al. 1993). Dieser und der sensitive Stammklon F4-6, wurde freundlicherweise für die Experimente zur Verfügung gestellt. Die weitere Kultivierung erfolgte dann im Institut für Pathologie der Universität Hamburg.

2.1.1 Materialgewinnung

Das Ausgangsmaterial für die Untersuchungen lag ursprünglich als solides Gewebe vor. Das Präparat wurde steril entnommen und möglichst frisch weiterverarbeitet. Das Gewebe wurde in Stücken von ca. 0.3 cm Kantenlänge bei Raumtemperatur in Transportmedium eingebracht. Bei der Aufbereitung der Präparate kam es auf eine möglichst schonende und vollständige Dissoziation der Zellen an, wodurch eine größere Ausbeute an vitalen Zellen zu erwarten war. Dieses ist nötig, da zellreiche Kulturen aus Primärtumoren besser wachsen als zellarme, und somit die Anwachsrate erhöht wird (Arps 1988). Zunächst wird das Gewebe vorsichtig mechanisch zerkleinert. Wenn dies noch nicht zu einer genügenden Auftrennung geführt hat, wird das Material zusätzlich enzymatisch aufbereitet. Benutzt wird hierfür ein Gemisch aus 0,8 U Dispase/ml und 0,1 U Kollagenase/ml (Arps 1988). Die mit dieser Methode erhaltenen Zellsuspensionen werden in 75 cm² Kulturflaschen (Fa. Nunc, Dänemark) mit 20 ml Kulturmedium ausgesät.

Tabelle 2.1 Primärtumoren, Bezeichnung der Zelllinie und zum jeweiligen Testzeitpunkt vorliegende Passage:

Zelllinie	Assay Datum / Passage	Transport Datum /Passage	Immunhistologie Datum / Passage
D 88/154 - WT	15.12.92, P 5	n.u.	n.u.
D 88/210 - MBN	03.12.92, P 3	06.07.93, P 10	n.u.
D 89/177 - NBL	19.01.93, P 5	15.03.93, P 7	n.u.
A 90/192 - WT	05.12.92, P 3	n.u.	23.03.93, P 5
A 91/014 - NBL	12.03.93, P 7	n.u.	23.03.93, P 8
A 91/041 - WT	13.11.92, P 3	22.02.93, P 7	26.03.93, P 8
A 91/049 - NBL	12.01.93, P 5	14.04.93, P 7	26.03.93, P 6
A 91/060 - TER	12.11.92, P 2	15.03.93, P 4	n.u.
A 92/005 - NBL	06.03.93, P 6	14.04.93, P 7	26.03.93, P 7
A 92/037 - NBL	28.02.93, P 5	29.06.93, P 7	23.03.93, P 5
A 92/041 - NBL	16.03.93, P 3	29.06.93, P 5	23.03.93, P 3

Abkürzungen: NBL= Neuroblastom; WT= Wilmstumor; MBN= mesoblastisches Nephrom, TER= Teratom, n.u.= nicht untersucht

2.1.2 Zellkultivierung

Als Inkubationsmedium für die Tumorzellkulturen diente Leibovitz L-15 Medium, dem folgende Zusätze beigefügt wurden (jeweils bezogen auf 500 ml Grundmedium): 50 ml fötales Kälberserum, 0.5 mg Glutamin, 3.1 mg Fetuin, 1.25 mg Transferrin, 0.56 g Natriumhydrogencarbonat, 40 IE Insulin, 50 ml MEM Vitamine, sowie 250 mg Glukose. Die Kultivierung der F4-6 Zellen erfolgte mit alpha-MEM Medium, dem folgendes hinzugefügt wurde: 5 % Penicillin / Streptomycin (10000 U/ml, 10000 µg/ml), 5% Glutamin, 10% fötales Kälberserum (Schaefer et al. 1993).

Die Inkubationstemperatur lag bei 37⁰ C (Inkubator: Stericult, Fa. Labotec, Göttingen), analog der Körpertemperatur des Menschen. Die Brutschränke mußten eine 95% ige Luftfeuchtigkeit aufweisen, um einer Verschiebung der Konzentrationen und der Osmolarität durch Verdunsten von Medium aus den Kulturflaschen entgegenzuwirken. Die Begasung der Schränke erfolgte mit atmosphärischer Luft incl. 5% CO₂. Nach durchschnittlich 3 Tagen sind die Substrate des Kulturmediums in den Flaschen aufgebraucht und es muß gewechselt werden. Dies wird durch den Indikator im Medium (Phenolrot) optisch angezeigt (Umschlag nach gelb bei pH 6.4 - 6.8). Dazu wird das verbrauchte Medium entfernt, die Kulturflaschen werden mit 5 ml PBS gewaschen und es werden 20 ml frisches Medium pipettiert.

2.1.3 Passagierung der Kulturen

Um die in vitro wachsenden Monolayer dauerhaft zu halten, bzw. auch um die Zellen einzufrieren oder zu ernten, müssen die Kulturen in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit passagiert werden. Dies geschieht, indem das Kulturmedium entfernt wird und die Zellen sodann für 10-15 min. mit einer 0.05 % Trypsinlösung in 0.05 % EDTA überschichtet werden. Es kommt zu einer Ablösung des Zellrasens vom Boden der Kulturflasche und zu einer Lösung der Zell-Zell Verbindungen. Diese Einzelzellsuspension kann durch Zugabe von Medium in einer definierten Zellzahl ausgesät werden. Durch Überführen der zentrifugierten Zellen (5 min. bei 1000 U/min, Zentrifuge: GPK, Fa. Beckmann) in 1 ml einer Lösung aus 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) können die Zellen in Kulturmedium bei -18⁰C einige Stunden vorgekühlt werden, um dann bei -80⁰C tiefgefroren zu werden.

Die F 4-6 Zellen werden analog behandelt. Das Trypsinieren ist hierbei nicht nötig, die Zellen werden mit einem Zellschaber (Cell scraper, Fa. Costar, Cambridge) vom Boden der Kulturflasche gelöst und in einer Lösung aus 10 % DMSO in alpha MEM- Medium tiefgefroren.

Die Zellzahlen werden durch Zählung mit der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer eingestellt, bei den Primärkulturen aus dem trypsinierten Gemisch, bei den F4/6 Zellen direkt aus dem Medium nach Zugabe von Trypanblau. Als Probengefäß zum Tieffrieren dienen jeweils Kryoröhrchen mit Schraubstopfen (2 ml Inhalt) der Fa. Nunc, Dänemark.

Die untersuchten Zellkulturen der Primärtumoren wurden alle aus bereits tiefgefrorenen Proben rekultiviert und lagen bei den Versuchen in verschiedenen Passagen vor (P=2 bis P=10, siehe auch Tabelle 2.1, Seite 11).

2.1.4 Rekultivierung der Proben

Die tiefgefrorenen Zellsuspensionen werden bei Raumtemperatur vorsichtig aufgetaut. Danach werden sie in ein steriles 10 ml Reagenzglas mit Kulturmedium überführt, bei 1000 U/min 5 min. zentrifugiert und, nach vorsichtigem Dekantieren des Überstands, das Pellet mit neuem Kulturmedium aufgenommen und in einer 75 cm² Kulturflasche mit 20 ml Medium ausgesät.

2.1.5 Dekontamination

Ein Problem bei der Primär- und Langzeitkultur von Zellen stellt die Kontamination durch Mikroorganismen dar. Dies kann bei primär sterilen Kulturen durch Unachtsamkeit bei der Handhabung, Kontamination von Medien, oder durch Sprunginfektion aus bereits kontaminierten Kulturen, die im gleichen Brutschrank lagern, entstehen. Bei der in vitro Sanierung der Infektionen mit Antibiotika und Antimykotika werden u.U. zytotoxische Effekte auf die kultivierten Zellen wirksam, da zwischen verwendeten Antibiotika und Zytostatika Strukturverwandschaften bestehen. Bei Kulturen, die auf Dauer nur unter Zugabe von Antibiotika/Antimykotika wachsen, bleibt daher unklar, ob ein beobachteter Effekt in dem Zytostatikatest nur durch das zu untersuchende Substrat, oder durch eine Kombinationswirkung zwischen Substrat und Antibiotikum erreicht worden ist. In den 6 Fällen, in denen bei den hier untersuchten Kulturen eine Kontamination auftrat (siehe Tab. 2.2), wurde folgendermaßen verfahren:

Bei einer vermuteten Infektion mit Mykoplasmen wurde die Kultur initial mit Mykoplasma removal agent (MRA, Fa. Dainippon Co. & ICN Biomedicals, England) behandelt (0,5 µg/ml Medium). Bei dem Fall einer bakteriellen Kontamination kam eine Kombination aus Penicillin/Streptomycin (100 U;100 µg) / (ml Medium) und Neomycin/Bacitracin zum Einsatz (10µg; 0,5 U) / (ml Kulturmedium). Nach einer Behandlungsdauer von einer Woche kamen die Kulturen wieder in antibiotikafreies Medium und wurden eine weitere Woche beobachtet. Bei Zeichen einer Reinfektion wurde ein weiterer einwöchiger Versuch zur Dekontamination mit Antibiotika gemacht.

Waren die Kulturen danach noch immer nicht dekontaminiert, wurden sie verworfen und eine frühere, nicht kontaminierte Passage rekultiviert (4 Fälle).

Tabelle 2.2 Antibiotische/Antimykotische Behandlung der Zellkulturen

Zelllinie	Art der Behandlung*	Zeitraum
D 88/210	Antibiose	1 Woche
A 90/192	Antibiose	insgesamt 3 Wochen
A 91/014	MRA	1 Woche
A 91/041	Antibiose	insgesamt 2 Wochen
A 91/060	Antibiose	insgesamt 2 Wochen
A 92/005	MRA	1 Woche

* Antibiose= Penicillin/Streptomycin + Neomycin/Bacitracin

MRA= Mykoplasma Removal Agent

2.2 Sensitivitätstestung

Zur Untersuchung der Substanzsensitivität wurde der Monolayer-Proliferationsassay (Dietel et al. 1987) angewendet. Da alle getesteten Kulturen primär schon einmal getestet worden waren, konnte die Übereinstimmung der Testergebnisse mit den Vorbefunden als ein Maß für die Reproduzierbarkeit des Experimentes gelten.

Die Testung erfolgte in 12x Cluster-Petrischalen (Dietel et al. 1986; Arps 1988). Pro Cluster wird eine definierte Zahl Zellen ausgesät (10000 pro Napf). Diese Zellen werden zunächst für 2 oder 3 Tage unter normalen Inkubationsbedingungen gehalten, um ihnen das Absetzen auf dem Schalenboden und das Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase zu ermöglichen.

Nach abschließendem Mediumwechsel (1 ml Kulturmedium pro Napf), werden die zu testenden Zytostatika, in den jeweiligen Konzentrationen in 3 parallelen Ansätzen, dem Medium für 3 Tage zugefügt (Arps et al. 1987). Am Ende des Testes wird nach Trypsinierung die Zahl lebender Zellen unter Einwirkung der verschiedenen Zytostatikakonzentrationen (ZZ K1- ZZ K3) mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal Zählkammer ermittelt (Mikroskop: Phasenkontrastmikroskop, Fa.Olympus).

Am Tag 0 und Tag 3 des Testes wird die Zellzahl aus jeweils 6 Clustern ermittelt (ZZ prae und ZZ post), wobei ZZ prae als Ausgangskontrollwert definiert ist und ZZ post den Endwert der unbehandelten Kontrollkulturen darstellt. Bei Testsubstanzen, die in speziellen Lösungsmitteln gelöst werden, muß dieses in gleicher Konzentration der Endkontrollgruppe zugefügt werden um den Effekt der auf die Zellen ausgeübt wird, nicht als Wirkung der Testsubstanz fehlzudeuten.

Dieses ergibt sich aus der Tatsache, daß Lösungsmittel (in den Versuchen anzuwenden bei Dexniguldipin = 1% DMSO) per se antiproliferativ oder auch wachstumsfördernd wirken können. Als Maß für die Wirksamkeit der zu untersuchenden Substanzen, wird die relative Wachstumsveränderung unter ihrer Einwirkung verwendet. Als Vergleichsgröße dient hierbei die Zunahme der Zellzahl in den unbehandelten Kontrollgruppen (ZZ diff). Diese Größe wird aus der Differenz zwischen den am Tag 0 (ZZ prae) und 3 (ZZ post) bestimmten Zellzahlen ermittelt :

$$\mathbf{ZZ\ diff = ZZ\ post - ZZ\ prae.}$$

Für den Vergleich mit den behandelten Ansätzen wird ZZ diff gleich 100 % gesetzt. Für jede der 3 zugesetzten Substanzkonzentrationen (Ki) wird sodann die Zellzahl unter Applikation bestimmt und als relatives Wachstum im Verhältnis zu ZZ diff ausgedrückt (W Ki %). Hierzu wird die Differenz der unter Substanzapplikation erreichten Zellzahl (ZZ Ki) und der Ausgangskontrolle (ZZ prae) gebildet. Zur prozentualen Darstellung wird diese Differenz danach durch ZZ diff dividiert und mit 100 multipliziert:

$$\frac{\mathbf{(ZZ\ Ki - ZZ\ prae) \times 100}}{\mathbf{ZZ\ diff}} = \mathbf{W\ Ki\ \%}$$

mit i = 1, 2 oder 3

Die so errechneten relativen Wachstumswerte (W Ki %) und der Ausgangskontrollwert von 100 % können dann grafisch gegen die Konzentrationstufen K1 - K3 aufgetragen werden. Als Korrelat für die klinische Auswertung wurde ein Sensitivitätsindex definiert.

Hierbei wird die Wachstumskinetik der Zellen mit den erreichten relativen Wachstumswerten bei K2 in Zusammenhang gebracht:

$$\text{Index} = (\text{ZZ post} / \text{ZZ prae}) \times \text{WK2} \%$$

Da in der klinischen Erprobung von DNIG Konzentrationen von nahezu 1,0 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurden (Karck et al. 1992, Wolf et al. 1991), wurde für die Substanz Dexniguldipin der Sensitivitätsindex mit den relativen Wachstumswerten bei K3 (entsprechend 1 $\mu\text{mol/l}$) berechnet:

$$\text{Index (DNIG)} = (\text{ZZ post} / \text{ZZ prae}) \times \text{WK3} \%$$

Da die F4-6 / F4-6ADM2^R Zellen zum großen Teil nicht als Monolayer auf dem Boden der Inkubationsgefäße, sondern in erster Linie in Suspension in ihrem Kulturmedium wachsen, ergibt sich, daß der größte Teil der lebenden Zellen mit abgesaugt würde wenn am Tag 1 des Testes das Medium gewechselt und die Zytostatika appliziert werden. Gleiches gilt somit auch für den Tag 3 beim Vorgang des Trypsinierens. Daher wird der Test, um den Absaugvorgang zu vermeiden, nach der Pipettierung der jeweiligen Zytostatikakonzentrationen (K1 - K3) ausgesät. Nach der 3-tägigen Inkubation unter Substratapplikation werden die Cluster nicht trypsiniert, sondern es wird die Zahl der lebenden Zellen mit der Fuchs-Rosenthalkammer direkt aus dem Medium bestimmt. Hierbei werden die adhärent wachsenden Zellen in jedem Cluster vorher mit einem Zellschaber gelöst, dies wird mikroskopisch kontrolliert.

Zusätzlich wurde eine Wachstumskontrolle jeder Zelllinie über 7 Tage nacheinander in 6 x Cluster-Petrischalen ausgewertet. Hierbei wird, wie vorher beschrieben, wieder pro Napf eine bestimmte Zellzahl ausgesät, und alle 48 Stunden nach Trypsinierung die Zahl lebender Zellen ermittelt. Die Darstellung der absoluten Zellzahlen im Bezug zur Zeit (Zählung nach 24, 72, 120 und 168 Stunden) stellt das unbeeinflusste Wachstumsverhalten der Zelllinien dar.

2.3 Zytostatika

Für den Monolayerproliferationsassay wurden insgesamt 7 verschiedene Zytostatika ausgewählt. Aus der Gruppe der MDR-assoziierten waren dies: Vincristin, Doxorubicin und Daunorubicin. Um auch Medikamente zu erfassen, die üblicherweise nicht mit der Multidrugresistance im Zusammenhang stehen, wurden Methotrexat, Cis-Platin und Novantron genutzt. Zusätzlich testeten wir Dexniguldipin als proliferationshemmende Substanz und, in Kombination mit Doxorubicin, in seiner Wirkung als MDR- Modulator.

Die Wirkspiegel der verschiedenen Substanzen im Test errechneten sich aus den patientenbezogenen Dosierungsanweisungen nach Körpergewicht und Körperoberfläche eines Standardpatienten (70 kg, 1,7 qm KOF, 14 l EZF). Bei unterschiedlicher Dosierung entsprachen sie der mittleren Dosierung. Die anhand dieser Dosierung errechnete Konzentration wurde als maximale Konzentration K 3 im Assay eingesetzt. K2 und K 1 entsprachen jeweils 0,1 x K3 bzw. 0,01 x K3.

Beim Vergleich der in der Literatur angegebenen Daten für Serumspiegel bzw. EZF-Konzentrationen mit diesen Angaben, zeigt sich, daß K 2 den Serumkonzentrationen vergleichbar ist, die in vivo 2 h nach i.v.-Applikation gemessen werden können (Chabner 1982, Dittrich 1987).

Die Verdünnungen für die Testreihen wurden aus den jeweiligen Stammlösungen stets frisch angesetzt. In der Literatur wird beschrieben, das wiederholtes Auftauen die Wirksamkeit von Zytostatikalösungen beeinflussen kann (Bosanquet 1985). Daher wurden tiefzufrierende Stammlösungen jeweils in Portionen aliquotiert. Eine Übersicht der verwendeten Substanzen zeigt Tabelle 2.3

Tabelle 2.3 Übersicht über die verwendeten Substanzen

Substanz	Hersteller	Stammlösung und Lagerung	Konzentration		
			K1	K2	K3
Doxorubicin (ADR)	Farmitalia GmbH	10 mg Trockensubstanz in 5 ml NaCL, -20°C	5 ng/ml	50 ng/ml	500 ng/ml
Daunorubicin (DNR)	Farmitalia GmbH	20 mg Trockensubstanz in 10 ml NaCL, -20°C	25 ng/ml	250 ng/ml	2.5 µg/ml
Vincristin (VCR)	Fa. Lilly Giessen	10 mg Trockensubstanz 10 ml NaCL, 4°C (1 Monat)	0.5 ng/ml	5 ng/ml	50 ng/ml
Methotrexat (MTX)	Fa. Lederle Cyanamid	Ampulle = 5 mg Methotrexat 4 °C	1.4 ng/ml	14 ng/ml	140 ng/ml
Cisplatin (CDDP)	Fa. Bristol Arzneimittel	20 ml Lsg. =10 mg Cisplatin nicht über 25°C	50 ng/ml	500 ng/ml	5 µg/ml
Novantron (NOV)	Fa. Lederle Cyanamid	Amp.=25 mg NOV in 12.5 ml nicht über 25°C	2 ng/ml	20 ng/ml	200 ng/ml

2.3.1 Dexniguldipin (DNIG)

Von der Firma BYK Gulden, Konstanz wurde die Substanz B 859-35 (Dexniguldipin-HCL) zur Verfügung gestellt. Die Trockensubstanz wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) aufgelöst. Für diese Substanz gibt es nur wenig klinisch erprobte Konzentrationen (s.o.). Da der Einfluß von DNIG als Chemosensitizer auf Antracycline (exemplarisch mit Doxorubicin) untersucht werden sollte, wurden in diesem Fall 4 unterschiedliche Testkonzentrationen definiert. DNIG wurde unter Lichtschutz und mit gesättigten Pipettenspitzen und nur in Glasgefäßen verarbeitet. Als Konzentrationen wurden festgelegt:

$$K 1 = 0,01 \mu\text{mol/l} = 6,5 \text{ ng/ml}$$

$$K 2 = 0,1 \mu\text{mol/l} = 65 \text{ ng/ml}$$

$$K 3 = 1,0 \mu\text{mol/l} = 650 \text{ ng/ml}$$

$$K 4 = 3,0 \mu\text{mol/l} = 1,95 \mu\text{g/ml}$$

2.4 Antracyclintransportmessung

Der Antracyclintransport der Zellen wurde exemplarisch mit Doxorubicin gemessen. Untersucht wurde das Verhalten der Zellen bei Zugabe von Doxorubicin alleine (Kontrollgruppe, ADR 1.5 $\mu\text{mol/l}$), und bei Applikation von Doxorubicin in Verbindung mit Dexniguldipin (DNIG 3.0 $\mu\text{mol/l}$). Das Prinzip des Versuchs bestand darin, den Zellen in ihrem üblichen Nährmedium das Transportsubstrat in einer radioaktiv markierten Form anzubieten (Reymann et al. 1993). Verwendet wurde Doxorubicin in Form von 14-[^{14}C]-ADR Hydrochlorid (Fa. Amersham & Buchler GmbH, Braunschweig) und unmarkiertes Dexniguldipin.

Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Zellen durch eine Silikonölschicht in Trichloressigsäure (TCA 10 %) zentrifugiert, wo die Zellbestandteile dann in ihre säurelöslichen und säurefällbaren Anteile aufgeschlossen wurden, so daß das Substrat jeweils in beiden Phasen, sowie im zellfreien Überstand getrennt nachgewiesen werden konnte (schematische Darstellung des Versuchsablaufs in Abb. 2.1).

Um die für die Transportversuche nötige Dichte an Zellen zu erhalten, wurden die Kulturen nach Trypsinierung in 175 cm^2 - Kulturflaschen (Falcon, Fa. Becton Dickinson, Frankreich) überführt. Untersucht wurde der Transport bei Konzentrationen von 3, 2 und 1 $\times 10^6$ Zellen/ml. Je nach Effektivität des vorhandenen Transportsystems, müssen die zu beobachtenden Effekte bei unterschiedlicher Zelldichte variieren (siehe Abb.2.2).

Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs im Antracyclintransportassay

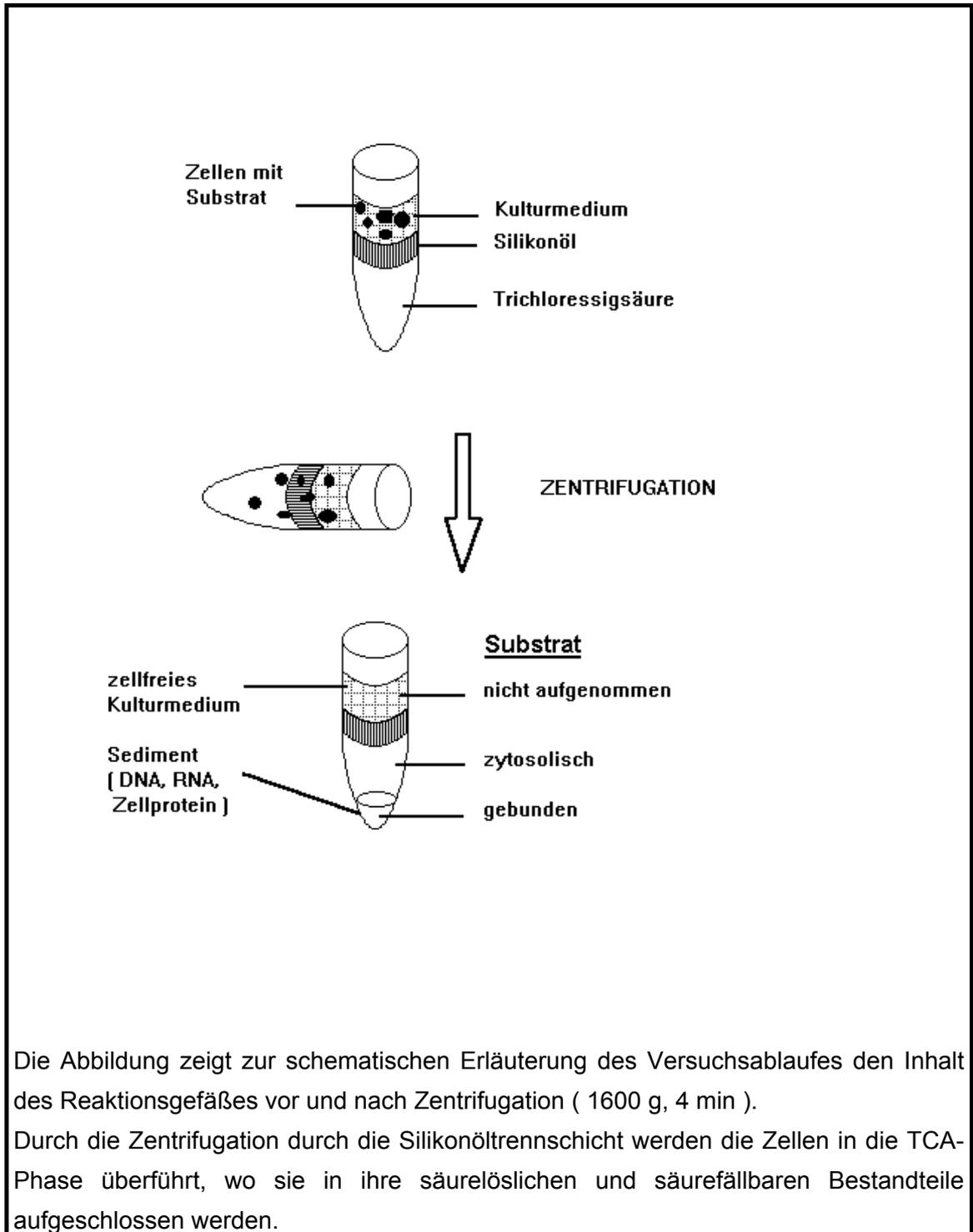
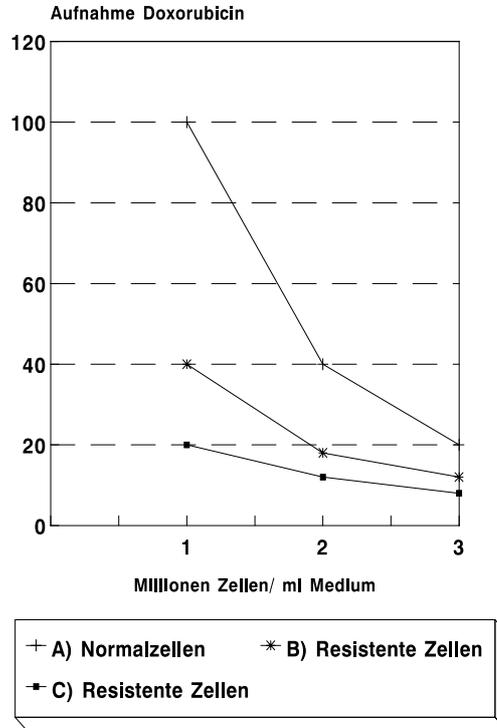


Abbildung 2.2

Zelldichte und Transporteffekte



Die Kurven A bis C stellen das unterschiedliche Verhalten verschieden effektiver Transportsysteme in der Zytostatikaaufnahme modellhaft dar. Durch Resistenzmodulation (Blockade des Exportsystems) kann Kurve C nach A überführt werden (effektives Transportsystem) bzw. nach B (schwaches Transportsystem), sodaß auch innerhalb einer Zellpopulation das Transportsystem experimentell dargestellt werden kann.

		<u>Effektivität des Transportsystems</u>	
		A) hoch	B) niedrig
<u>Zelldichte</u>	hoch	kleiner relativer Unterschied	kein Unterschied
	niedrig	großer relativer Unterschied	kleiner relativer Unterschied
		(Überschreiten von V max)	

Als Standard zur Berechnung der Konzentrationen wurde eine externe Markierungslösung benutzt. Um die Zerfallsrate pro Minute im Flüssigkeitsszintillationszähler messen zu können, war eine bestimmte Menge an radioaktiver Markierung nötig. Durch die spezifische Aktivität von ^{14}C -Doxorubicin (0.1 $\mu\text{Ci/ml}$) konnte errechnet werden, wieviel Doxorubicin nötig war um eine ausreichende Markierung zu erreichen. Anschließend wurde durch Zugabe von unmarkiertem Doxorubicin und entsprechender Verdünnung eine Endkonzentration von 1.5 $\mu\text{mol/l}$ Doxorubicin eingestellt.

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Zellen geerntet und auf eine Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Bei Zelllinien, die nicht in dem nötigen Maß gewachsen waren, wurde die nächst niedrigere Konzentration gewählt.

Die Reaktionsgefäße wurden im Wärmeblock (Thermostat 5320, Eppendorf Hamburg) auf 37°C vortemperiert, so daß die Zellen von der Erntung bis zum Versuchsende in ihrem Medium bei gleicher Temperatur gehalten wurden. Zum Zeitpunkt $t=0$ wurde die Markierungslösung in die mit der Zellsuspension gefüllten Inkubationsgefäße gegeben. Danach wurden die Gefäße noch einmal 30 min. im Wasserbad inkubiert. Während der Versuchszeit wurden die Gefäße permanent geschüttelt, da sich in den Vorversuchen gezeigt hatte, daß die Zellen bereits während der Inkubationszeit in den Reaktionsgefäßen festwuchsen. 5 min. vor Ablauf der Inkubationszeit wurden Proben (200 μl) der Zellsuspensionen vorsichtig auf die Silikonölphase der vortemperierten Reaktionsgefäße geschichtet. Nach genau 30 min. wurde die Versuchszeit durch Zentrifugation der Reaktionsgefäße bei 1600 g für 4 min. beendet.

Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Phasen unter dem Silikonöl präpariert indem das Reaktionsgefäß exakt solange in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, bis die TCA- Phase gefroren, das Silikonöl aber noch flüssig genug war, um abgesaugt werden zu können. Nach dem Auftauen der TCA -Phase wurde eine Probe aus dem Phasenüberstand entnommen und der Rest, unter Schonung des Präzipitats, vorsichtig abgesaugt. Zur Aufarbeitung des Pellets wurde dieser mit 10 % TCA gewaschen, in 1 M NaOH gelöst (30 min. bei 56°C) und mit 1 mol/l HCL neutralisiert. Aus allen 3 Phasen (säurelöslich, säurefällbar und Überstand) sowie der Markierungslösung, die als Standard für die Berechnungen diente, wurden die Proben direkt in Szintillationsflüssigkeit gemessen. Ein Teil des gelösten Präzipitats diente zur Bestimmung des Proteingehaltes jeder Probe.

2.4.1 Versuchsauswertung

Die Zerfallsrate pro Minute (DPM) der Proben wurden im Flüssigkeitszintillationszähler (Tri Carb 2000CA, Packard) gemessen. Dieser berechnete automatisch den Quench und das Probenkanalverhältnis für die gleichzeitige Messung von ^{14}C und ^3H Aktivitäten und korrigierte diese gegen einen Leerwert.

Durch die Zentrifugation wurde auch ein geringer Teil des Nährmediums durch die sedimentierenden Zellen in die TCA - Phase mitgerissen. Um diese Menge und das darin enthaltene Transportsubstrat bestimmen zu können, war der Zusatz von ^3H bzw. [^{14}C]-Inulin zur Markierungslösung notwendig, da dies sich nur extrazellulär verteilt und somit eine Quantifizierung dieses Volumens ermöglicht:

Aus den direkt zu bestimmenden Größen der im Kulturmedium verbliebenen Transportsubstratkonzentration und dem Volumen der mitgerissenen extrazellulären Flüssigkeit wurde die Substratmenge berechnet, die sich in diesem extrazellulären Volumen befand. Die Gesamtmenge des in der TCA-Phase gefundenen Substrates wurde dann um diesen Betrag korrigiert (Edens 1994).

Das in der TCA-Phase befindliche Substrat wurde als "zytosolisch" definiert und unter Bezug auf das Volumen des Versuchsansatzes als Konzentrationswert angegeben. Analog dazu wurde die im Präzipitat gefundene Substratmenge durch die gemessenen Zerfallsraten berechnet. Diese wurde als "gebunden" definiert und auf den Proteingehalt der Probe bezogen. Schließlich stellt die Summe dieser beiden Größen die "Gesamtaufnahme" dar, die auf den Proteingehalt der Probe bezogen wurde.

2.4.2 Proteingehalt

Aus dem im Reaktionsgefäß befindlichen Rest des Präzipitates, der nach dessen Aufarbeitung zurückblieb, wurde mittels des Bio-Rad^R Protein Assays (Bio-Rad, München) der Proteingehalt der einzelnen Proben ermittelt. Aus dem resuspendierten Pellet wurden 100 µl mit Aqua bidest 1:10 verdünnt und nach Zugabe des Bio-Rad-Reagenz bei 578 nm im Photometer (Eppendorf) gegen bovine Serumproteine (lyophilisiertes Plasma gamma Globulin und Plasma Albumin, Bio-Rad) gemessen.

2.4.3 Volumenmessung

Das Zellvolumen konnte direkt aus der gemessenen Differenz des Verteilungsvolumens von $^3\text{H}_2\text{O}$ und $[^{14}\text{C}]$ - Polyethylenglykol (PEG) berechnet werden. Dazu wurden die gleichen Reaktionsgefäße wie oben vorbereitet, mit dem Unterschied, daß hierbei die unterste Phase aus 2 M NaOH bestand, sodaß sich nach der Zentrifugation kein Präzipitat bildete.

Die Zellsuspension wurde direkt mit $^3\text{H}_2\text{O}$ (intrazelluläre Verteilung) und 1,2- $[^{14}\text{C}]$ -Polyethylenglykol 4000 (PEG) (extrazelluläre Verteilung) doppelt markiert. Aus der Markierungslösung wurde ein Aliquot als Standard abpipettiert.

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 2.4.1 angegeben und wurde nach 30 min durch Zentrifugation beendet. Im Anschluß daran wurde das Reaktionsgefäß noch einmal für 1 h bei 56 °C inkubiert und mit 2 N HCl neutralisiert. Danach wurde eine Probe entnommen (300 µl) und in Szintillationsflüssigkeit gemessen. Aus den in der Probe und aus der Standardlösung bestimmten Zerfallsraten pro Minute für $^3\text{H}_2\text{O}$ und ^{14}C sowie der eingesetzten Zellkonzentration konnte sodann das Zellvolumen berechnet werden.

2.5. Immunhistochemische Untersuchungen

Benutzt wurden die drei monoklonalen Antikörper (MAB) JSB-1 (Fa. Sanbio bv, Niederlande), C 219 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Victor Ling, Ontario) und MRK 16 (Fa. Behring, Deutschland). Die Antikörper C 219 und JSB-1 markieren intracytoplasmatische Domänen des P-Glykoprotein, während MRK 16 eine extrazelluläre besetzt. Für die Behandlung mit C 219 und JSB-1 wurden die Zellen mit Aceton bei 4°C für 10 min fixiert (Dietel 1991). Für MRK 16 erfolgte das Fixieren mit 4 % Formalin bei - 20°C für 10 min. (Hamada und Tsuruo 1990). Die Endkonzentration der Antikörper betrug 10 µg/ml bei C 219 und JSB 1 (Dietel et al. 1990) und 5 µg/ml für MRK 16 (Hamada und Tsuruo 1990).

Zum Nachweis des p-170 Glykoproteins diente bei den Zellkulturen eine Immunhistochemische Färbung nach APAAP. Hierbei wird ein Brückenantikörper (Rabbit-Anti-Mouse IgG, Fa. Dakopatts, Dänemark) der sich gegen IgG derjenigen Tierspezies richtet, von der spezifische 1. Antikörper stammt, benutzt. Im Anschluß daran werden zur Durchführung einer Farbreaktion Peroxidasemoleküle an die Brücken gebunden. Die Farbreaktion ermöglicht somit die Antigenlokalisation. Zur Durchführung der Versuche werden mit Zellen bewachsene Objektträger benötigt.

Die untersuchten Primärkulturen wurden nach Trypsinierung auf sterile Objekträger ausgesät. Nach einer halben Stunde, in der die Zellen Gelegenheit hatten sich abzusetzen, wurden sie vorsichtig mit Kulturmedium überschichtet und zur Inkubation bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Das Zellwachstum auf den Objekträgern wurde mikroskopisch beurteilt. Nachdem eine genügende Anzahl Zellen vorhanden war, erfolgte die Fixation. In 4 Fällen ergab die Färbung ein mangelhaftes Ergebnis, da die Zellen durch Kontamination während oder nach der Fixation zu stark geschädigt waren.

Die Aussaat der F4-6/ADM2^R Zellen erfolgte mittels einer Zytozentrifuge (Fa. Shandon). Nach dem Aufbringen erfolgte hier dann die Fixation direkt im Anschluß. Nach Durchführung der Färbung wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt und fotografiert.

2.6 Klinischer Krankheitsverlauf

Zur Auswertung des Krankheitsverlaufes wurden die Krankenakten der Patienten eingesehen und nach bestimmten Kriterien beurteilt. Die Akten stellte die onkologische Ambulanz der Kinderklinik im Universitätskrankenhaus Eppendorf (Prof. Dr. med Erttmann) freundlicherweise zur Verfügung. In einem Fall stammten die Informationen aus dem Berliner Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Abteilung Pädiatrie/Onkologie von Prof. Dr. med G. Henze. Die Beurteilungskriterien waren im einzelnen:

- Wie und wann wurde die Diagnose gestellt
- Größe und Staging des Tumor, verifizierende Untersuchungen
- Therapie (Operation, Chemotherapie, adjuvante Therapie)
- Verlauf der Erkrankung / Untersuchungen
- Herkunft des Gewebes für den Proliferationsassay
- Datum der Gewebsentnahme (vorbehandelt, nicht vorbehandelt)
- Vergleich der durchgeführten Proliferationsassays
- Korrelation Krankheitsverlauf / Prädiktion durch den Assay

Der Krankheitsverlauf wurden entsprechend den Richtlinien der WHO eingeteilt (1979). Diese fordern einen mindestens 4 monatigen Beobachtungszeitraum nach Beginn der Chemotherapie und unterteilen die Verläufe in 5 Gruppen:

1. Vollremission (complete remission, CR)

Die Reaktion eines Patienten auf die Chemotherapie wird als Vollremission bezeichnet, wenn bei 2 maliger Kontrolle in einem Abstand von mehr als 4 Wochen keine Zeichen oder Symptome der Tumorerkrankung mehr zu finden sind.

2. Teilremission (partial remission, PR)

Die Reduktion der Gesamttumormasse wird bei zweimaliger Messung im Abstand von mehr als 4 Wochen jeweils größer als 50 % eingeschätzt, ohne den Kriterien der CR zu genügen.

3. Minimales Ansprechen (minimal response, MR)

Reduktion der Gesamttumormasse unter den gleichen Bedingungen um mehr als 25 %, jedoch weniger als 50 %.

4. Stabile Krankheitsphase (no change, NC)

Tumorgrößenveränderungen um 25 % nach oben oder nach unten werden als stabile Krankheitsphase betrachtet.

5. Tumorprogression (progressive disease, PD)

Bezeichnung der Zunahme der Tumormasse um mehr als 25 % oder das Auftreten von bisher unbekanntem Tumormanifestationen.

Um die Vorhersage durch den Assay mit dem tatsächlichen Verlauf vergleichen zu können dient, wie oben erwähnt, der Sensitivitätsindex. Da hierbei der Wirkspiegel der Zytostatika benutzt wird, der einer *in vivo* Situation am nächsten kommt, und die Proliferation des Tumorgewebes zusätzlich berücksichtigt wird, kann am ehesten eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit von Wirksamkeit oder Versagen der Zytostatika getroffen werden. Für die *in vitro* Ergebnisse wurde definiert:

- Ein Zytostatikum mit einem Index > -40 wird als "unwirksam" eingestuft und dem Ergebnis "resistent" zugeordnet.
- Ein Zytostatikum mit einem Index < -80 wird als "wirksam" eingeordnet, entsprechend dem Ergebnis "sensibel".
- Indices zwischen -40 und -80 gelten als "fraglich wirksam" und lassen keine eindeutige Interpretation zu.

Es wurden für die Beurteilung der *in vitro* / *in vivo* Korrelation der klinisch verwendeten Zytostatikakombinationen folgende Kriterien festgelegt:

- Ein richtig positives Testergebnis (S/S) liegt vor, wenn innerhalb einer verwendeten Zytostatikakombination mindestens eine Substanz als wirksam getestet wurde und der Tumor mit CR, PR oder MR reagiert.
- Ein richtig negatives Ergebnis (R/R) liegt vor, wenn alle innerhalb einer Kombination angewendeten Zytostatika als unwirksam getestet wurden und der Tumor mit NC oder PD reagiert.
- Ein falsch positives Testergebnis (S/R) liegt vor, wenn innerhalb einer Kombination mindestens ein im Assay wirksames Medikament vorlag und der Tumor NC oder PD reagierte.
- Ein falsch negatives Ergebnis (R/S) liegt vor, wenn alle in der Kombination verwendeten Medikamente im Assay unwirksam waren und der Tumor CR, PR oder MR reagierte.

3. Ergebnisse

3.1 Überblick über die Ergebnisse

Da die Ergebnisauswertung eine Vielzahl von Daten umfaßt, wird hier zunächst ein Überblick gegeben, ehe dann die fallorientierte Darstellung der Daten folgt. Wie die Ergebnisse im Modell aussehen, ist unter 3.3 anhand der untersuchten Referenzlinien zu sehen.

Alle 11 Zelllinien konnten im Proliferationsassay getestet werden. Der Antracyclintransport und die immunhistologischen Untersuchungen wurden jeweils in 8 bzw. 7 von 11 Fällen untersucht. Tabelle 3.1 zeigt die Charakterisierung der untersuchten Primärkulturen. Die Vorhersage des Primärassays bezieht sich auf die in den entsprechenden Fällen getesteten Zytostatika, die im klinischen Verlauf appliziert wurden. Bei Fällen, bei denen eine Chemotherapie nicht durchgeführt wurde, konnte keine Kontrolle der Vorhersage erfolgen. Ebenso verhält es sich bei Fällen, bei denen ein fragliches Testergebnis resultierte und bei Patienten, die zwar eine Chemotherapie erhielten, aber postoperativ sicher tumorfrei waren.

Tabelle 3.1 Charakteristik der untersuchten Primärkulturen

Linie	Proliferationsassay				Transport-assay	Immun-histochemie	
	Chemo vor PE	ADR	ADR + DNIG	DNIG	TRA	PGP: JSB-1	Verlauf
D 88/154 - WT	N	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	CR
D 88/210 - MBN	N	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	CR
D 89/177 - NBL	N	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	CR
A 90/192 - WT	J	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	CR
A 91/014 - NBL	N	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	PD
A 91/041 - WT	J	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	PD
A 91/049 - NBL	N	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	CR
A 91/060 - TER	N	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	CR
A 92/005 - NBL	J	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	CR
A 92/037 - NBL	J	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	PR
A 92/041 - NBL	J	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MR

Abk.:TRA=Transportassay; PGP=Immunhistologie (MAB JSB-1); ADR=Doxorubicin
DNIG=Dexniguldipin, J=ja; N=nein; (+) = untersucht; (-) = nicht untersucht

Eine Zelllinie wurde als MDR-positiv eingestuft, wenn in den immunhistologischen Untersuchungen das PGP nachgewiesen werden konnte, sich in dem Transportassay ein MDR-typischer Effekt bot, oder beide Ergebnisse positiv waren. Zusätzlich wurde das Ergebnis des Monolayerproliferationsassay und das klinische Verhalten mit einbezogen. Ergab sich ein MDR-typisches Bild, ohne daß PGP nachgewiesen werden konnte, wurde die Zelllinie als "atypische MDR" eingestuft.

3.1.1 Vorbefund und Verlauf

Setzt man Vorhersage und Verlauf der Krankheit zueinander in Bezug resultieren folgende Ergebnisse:

- In 5 von 11 untersuchten Fällen war im Bezug auf die Chemotherapiewirkung keine Aussage möglich. 4 Fälle verliefen klinisch CR, einer MR.
- Von 5 Zelllinien mit der Vorhersage "Tumor sensibel" bzw. "Zytostase wirksam" reagierten 3 Patienten klinisch mit CR, einer mit PR und einer mit PD. Dies ergibt 4 richtig positive und eine falsch positive Bewertung, der falsch MDR-positiv getestete reagierte ebenfalls mit CR.
- In einem Fall mit der Voraussage "Tumor resistent" bzw. "Zytostase unwirksam" reagierte der Patient mit klinisch PD. Es ergibt sich 1x richtig negativ.

Insgesamt resultieren 4 richtig positive (S/S), ein richtig negatives (R/R) und ein falsch positives (S/R) Ergebnis. Dies entspricht bei 6 auswertbaren Krankheitsverläufen rein rechnerisch einer Vorhersagegenauigkeit von 83 % für ein richtig vorhergesagtes Testergebnis.

Betrachtet man die Fälle unter dem Aspekt, ob vor der Gewebsentnahme für den Zytostatikaassay eine zytostatische Behandlung mit "MDR-Medikamenten" erfolgte, ergibt sich folgendes Bild:

- 5 Zelllinien stammen aus Gewebsentnahmen mit entsprechender Behandlung:

Bei 3 Neuroblastomen (A 92/005, A 92/037, A 92/041) wurde ADR unterschiedlich wirksam eingestuft (fraglich / wirksam / unwirksam). Der klinische Verlauf ist bei allen in Remission (CR / PR / MR). Das Kombinationsschema ADR + DNIG war bei allen wirksam getestet und im Antracyclintransport zeigten ebenfalls alle einen MDR-typischen Effekt.

Bei 2 Wilmstumoren (A 90/192, A 91/041) war in einem Fall (A 91/041) ADR sowie die Kombination ADR + DNIG unwirksam, der Verlauf PD und der Transporteffekt MDR-typisch. Im zweiten Fall (A90/192) wurde ADR und ADR + DNIG fraglich wirksam getestet, der Verlauf ist CR. Der Transporteffekt konnte nicht untersucht werden.

- 6 Zelllinien wurden vor der Gewebsentnahme nicht mit MDR-Medikamenten behandelt:

In einem Fall (NBL A 91/014) erfolgte zwar vor der Gewebsentnahme keine Chemotherapie, aber direkt im Anschluß und präoperativ. Hier verhielt es sich so, daß ADR und ADR + DNIG als wirksam getestet wurden, der Verlauf aber progredient war und mit dem Tod des Patienten endete. Der Transporteffekt konnte nicht untersucht werden.

In 2 Fällen (WT D 88/154, NBL A 91/049) resultierte folgendes Ergebnis: ADR fraglich (D 88/154), unwirksam (A 91/049), ADR + DNIG bei beiden wirksam. Transportassay: Kein Effekt bei A 91/049, nicht untersucht bei D 88/154. Postoperativ wurde in beiden Fällen eine Chemotherapie mit MDR-Medikamenten durchgeführt, der Verlauf ist bei beiden CR.

3 Fälle (NBL D 89/177, MBN D 88/210, TER A 91/060) erhielten auch postoperativ keine Chemotherapie und verliefen in kompletter Remission. Ergebnisse: ADR unwirksam (D 89/177, D 88/210), fraglich (A 91/060). Kombination ADR + DNIG: bei allen drei wirksam getestet. Der Transportassay ergab ein MDR-typisches Bild bei D 88/210, in den beiden anderen Fällen war kein Effekt zu verzeichnen.

3.1.2 ADR / DNIG / Kombination ADR + DNIG

Bei dem Vergleich der Wirksamkeit von Doxorubicin, Dexniguldipin und der Kombination ADR + DNIG, ergibt sich folgendes Bild:

- Von 5 als resistent gegen ADR getesteten Zelllinien war eine auf DNIG sensibel und 4 ebenfalls resistent. Durch die Kombinationstherapie wurden 4 sensibel, eine Zelllinie (Resistent gegen DNIG) bleibt resistent.
- Von 4 fraglich sensibel gegen ADR getesteten Fällen reagierten 2 auf DNIG sensibel, eine fraglich sensibel, sowie eine resistent. 3 Zelllinien wurden in der Kombinationstherapie als sensibel getestet, eine (gegen DNIG resistent) fraglich sensibel.
- Von 2 auf ADR sensibel getesteten Fällen war 1 gegen DNIG resistent, einer sensibel. In der Kombination sind beide sensibel.

In 7 Fällen ändert sich die Voraussage der Wirksamkeit von Doxorubicin durch die Kombination mit dem Modulator zum sensibleren Ergebnis hin (64 %). Von diesen Fällen sprachen *in vitro* 3 bereits auf DNIG allein besser an. 4 Zelllinien bleiben in der Bewertung gleich (36 %). Vergleicht man nur die als resistent oder fraglich sensibel gegen ADR getesteten Linien, verbessert sich das Testergebnis durch die DNIG-Kombination in 7 von 9 Fällen (78 %). Bei drei dieser 9 Zelllinien ist DNIG auch alleine wirksam. Betrachtet man die gegen DNIG fraglich sensiblen bzw. resistenten 7 Fälle, so erreicht man ein besseres Ansprechen des Tumors durch Kombination mit ADR bei 5 Zelllinien (71 %)

3.1.3 Transportassay

Es wurden 8 Fälle im Transportassay getestet. 3 Fälle konnten aufgrund mangelnden Wachstums nicht untersucht werden.

- 3 von 5 im Proliferationsassay gegen ADR resistent getestete Zelllinien zeigten einen Effekt bei Zugabe von DNIG. Bei zwei Linien war dies nicht zu beobachten.
- In den 7 Fällen, bei denen im Proliferationsassay ADR als fraglich oder resistent, und gleichzeitig die Kombination ADR + DNIG sensibel getestet wurde, zeigte sich in 3 Fällen ein Effekt, in ebensovielen war dies nicht zu sehen. Ein Fall konnte nicht untersucht werden.

3.1.4 Immunhistologie

In den immunhistologischen Untersuchungen ergab sich folgendes Bild: 7 Zelllinien wurden getestet. In allen Linien wurde nur mit JSB-1 eine Markierung erreicht. MRK-16 und C-219 waren bei allen Fällen negativ.

- In 3 CR verlaufenden Fällen war JSB-1 zu 66% positiv.
- In 4 PD, PR und MR verlaufenden Fällen ergab sich 4 x JSB-1 positiv (100%)
- In den 7 Fällen, die im Proliferationsassay gegen ADR resistent oder fraglich sensibel getestet wurden, sowie in der Kombination ADR + DNIG sensibel ergab sich JSB-1 zweimal positiv und einmal negativ. Vier dieser Fälle wurden nicht untersucht.
- Bei allen 5 Fällen, die mittels Transportassay und Immunhistologie untersucht wurden, zeigten diese Untersuchungen gleichsinnige Ergebnisse (Transporteffekt negativ = JSB-1 negativ bzw. beides positiv).

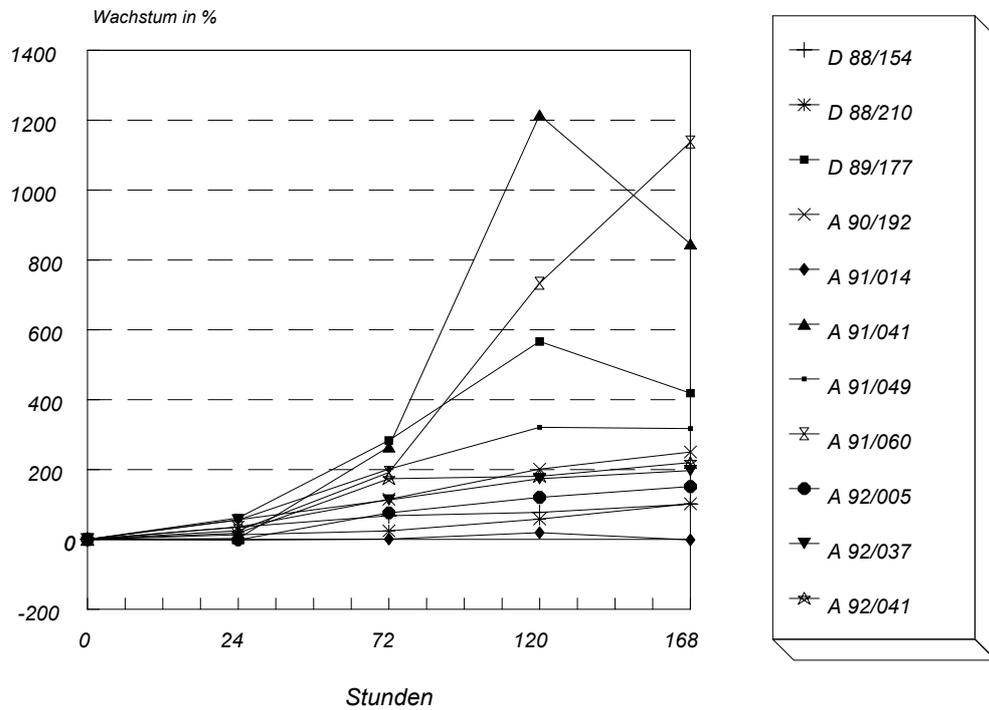
3.1.5 Wachstumskontrollen

In der Auswertung des Monolayerproliferationsassays wird das Wachstum der Zellkulturen mit berechnet. Daher war es nötig, von jeder untersuchten Zellkultur eine Wachstumskontrolle durchzuführen.

In Abbildung 3.1 und Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse der Wachstumskontrollen als relatives Wachstum und mit den absoluten Zellzahlen nach 24, 72, 120 und 168 Stunden dargestellt.

Abbildung 3.1

Wachstumskurven der Primärzellkulturen

**Tabelle 3.2**

Wachstumskontrollen der getesteten Zelllinien

Zelllinie, Passage	t = 0	24 h	72 h	120 h	168 h
D 88/154 P 5	10000	13562	16770	17760	20111
D 88/210 P 8	10000	8645	12447	15833	20208
D 89/177 P 5	10000	16145	38333	66667	51875
A 90/192 P 4	10000	13567	21510	30112	35015
A 91/014 P 7	10000	9843	10104	11927	9866
A 91/041 P 6	10000	10260	36510	131458	94583
A 91/049 P 5	5000	7760	15052	21041	20859
A 91/060 P 3	5000	6250	14583	41666	61875
A 92/005 P 6	10000	9870	17600	22036	25121
A 92/037 P 5	5000	7812	10625	13697	14843
A 92/041 P 3	10000	11770	27395	28072	32002

3.2 Fallorientierte Ergebnisdarstellung

3.2.1 Nephroblastom D 88/154

<u>Patient, A-Nr.:</u>	weiblich , D 88/154
<u>Geburtsdatum:</u>	09.12.1972
<u>Alter bei Diagnosedstellung:</u>	16 Jahre
<u>Diagnose:</u>	Nephroblastom, Mischtyp, T1, N0, M0

chronologischer Verlauf:

- Mai 88: Diagnose: seit 6 Monaten rezidivierende Makrohämaturie
IV-Urogramm, Angiographie, CT des Abdomens
- 03.06.88: Transabdominelle Tumornephrektomie , **Gewebe für Zellkultur**
- 07.06.88: über 6 Monate Chemotherapie: Actinomycin D, Vincristin
- Juli 89: malignes Melanom am Oberbauch, Clark Level 3, Therapie: Exzision
- bis 92: Verlauf: kein Anhalt für Rezidiv. Röntgen, Sonographie, Laborkontrollen

Zur Chemotherapie ist keine Aussage möglich, da die Patientin postoperativ tumorfrei ist. Verlauf CR. Antracyclintransport und Immunhistologie sind wegen mangelndem Wachstum und fehlender Reaktivierbarkeit der Zellkultur nicht untersucht worden. Alle im MPA getesteten Medikamente wirkten bei jeder Konzentration Wachstumshemmend. Bei Inkubation mit K2 war bei allen Substanzen, mit Ausnahme von Novantron, eine zytotoxische Wirkung zu beobachten. Bei Doxorubicin und Dexniguldipin war der Effekt dosisabhängig, bei den restlichen Zytostatika ist dies nicht eindeutig interpretierbar. Im Kombinationsversuch von Doxorubicin mit Dexniguldipin war bei jeder Konzentration Zytotoxizität darzustellen. Den Vergleich mit dem primär durchgeführten Proliferationsassay zeigt Tab. 3.3.

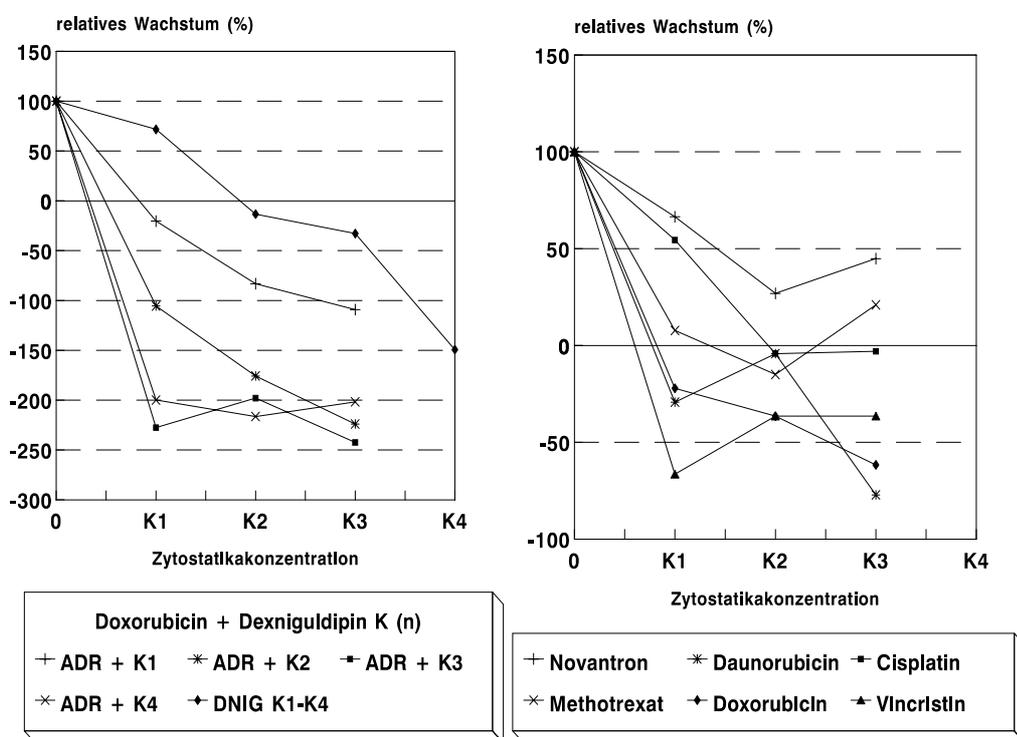
Tabelle 3.3 D 88/154: Vergleich der Versuchsergebnisse mit dem Primärassay

Zytostatikum	CDDP	NOV	MTX	VCR	ADR
Primärtest	-56	-54	+93	-99	-120
Versuch	-6	+37	-21	-50	-50

Sensitivitätsindex < -80 = wirksam, zw. -40 und -80 = fraglich, > -40 = unwirksam

Abbildung 3.2

Monolayerproliferationsassay D 88/154

**Tabelle 3.4** Einfluß der Zytostatika (relatives Wachstum bei K(n) in %) auf die Zellkultur D 88/154, Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	+54.5	-4.2	-3.0		-6	unwirksam
NOV	+66.5	+26.9	+44.9		+37	unwirksam
MTX	+7.8	-15.0	+21.0		-21	unwirksam
DNR	-29.3	-4.2	-77.2		-6	unwirksam
VCR	-66.5	-36.5	-36.5		-50	fraglich
ADR	-22.1	-36.5	-61.7		-50	fraglich
ADR +						
DNIG K1	-20.3	-83.2	-109.2		-107	wirksam
DNIG K2	-105.5	-175.8	-224.0		-226	wirksam
DNIG K3	-227.6	-198.0	-242.2		-255	wirksam
DNIG K4	-199.9	-216.5	-201.7		-278	wirksam
DNIG	+71.7	-13.4	-32.8	-149.3	-42	fraglich

3.2.2 konnatales mesoblastisches Nephrom D 88/210

Patient, A-Nr.: männlich, D 88/210
Geburtsdatum: 30.07.1988
Alter bei Diagnosestellung: 1 Monat
Diagnose: konnatales mesoblastisches Nephrom, T 1,N 0, M 0

chronologischer Verlauf:

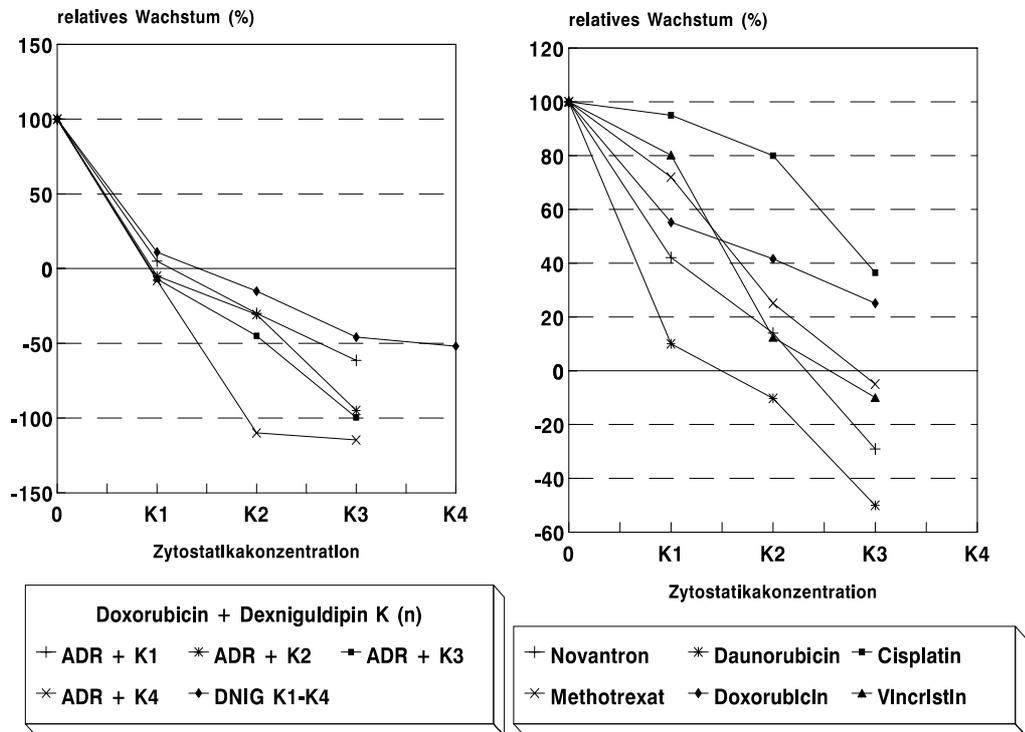
- 08/1988: Bei U 3 war ein ca. 5 cm großer Tumor im rechten Oberbauch zu tasten. Als Nebenbefund: Leistenhernie links. Verifizierung der Diagnose: IV-Urogramm, Abdomen-Sonographie. Labor: AFP 732 U/ml.
- 01.09.88: Tumornephrektomie rechts. Herniotomie links
Gewebe für Zellkultur
- Verlauf: bis einschließlich 1992 dokumentiert: Abdomen-Sonographie, Thorax-Röntgen: keine Anhalte für ein Rezidiv

Im Monolayerproliferationsassay wirkten alle Dosierungen nur schwach wachstumshemmend. Im Kombinationsversuch von Doxorubicin und Dexniguldipin kam es dagegen schon bei Konzentration K1 zu einem Proliferationstillstand. Die Zytostatikawirkung war hierbei und bei den einzeln getesteten Medikamenten dosisabhängig. Im durchgeführten Antracyclintransport ergab sich das Bild eines niedrig effektiven Transportsystems mit allenfalls geringen Auswirkungen bei 3 und 2 Millionen Zellen/ml und einem deutlichen Unterschied bei 1 Mill/ml. Die immunhistologischen Untersuchungen wurden nicht durchgeführt. Die Auswertung der Krankenakte erlaubt keine Aussage über die Zytostatikawirksamkeit. Die Patientin war postoperativ tumorfrei und im Verlauf auch ohne Chemotherapie in kompletter Remission.

Tabelle 3.5 D 88/210: Vergleich der Versuchsergebnisse mit dem Primärassay

Zytostatikum	CDDP	VCR	ADR
Primärtest	+47	+31	-45
Versuch	+152	+24	+79

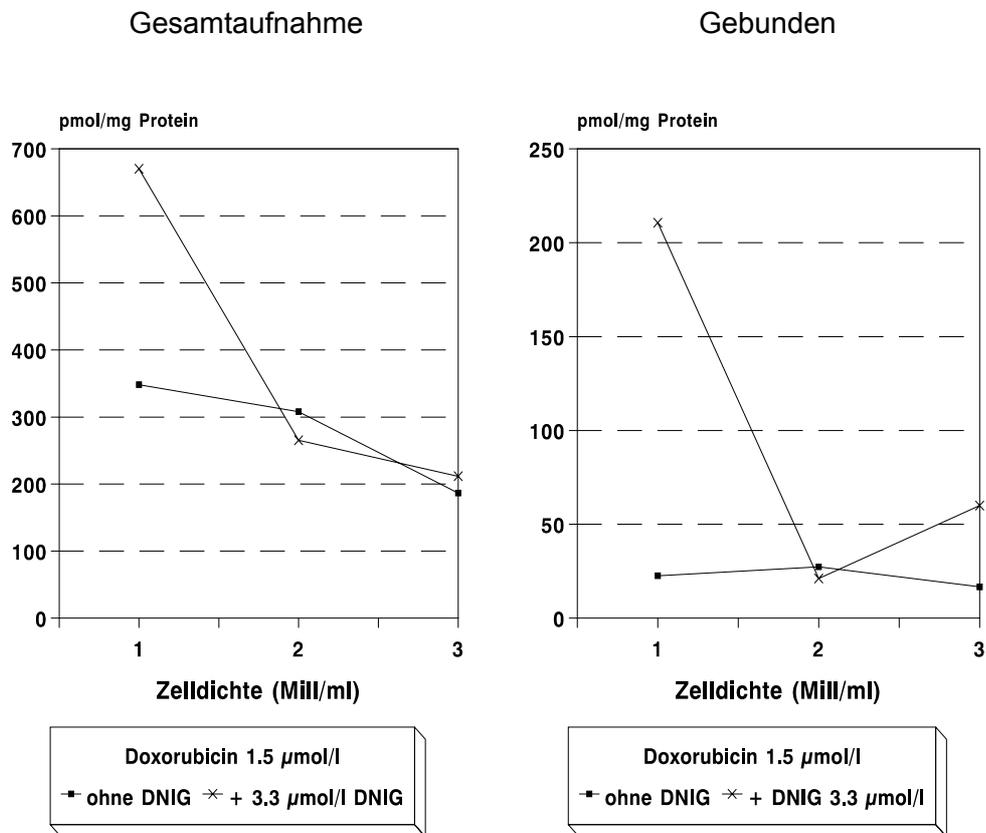
Sensitivitätsindex < -80 = wirksam, zw. -80 und -40 = fraglich, > -40 = unwirksam

Abbildung 3.3 D 88/210 Monolayerproliferationsassay**Tabelle 3.6** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur D 88/210 (relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	+95.0	+80.0	+36.5		+152	unwirksam
NOV	+42.1	+14.0	-29.1		+27	unwirksam
MTX	+72.0	+25.1	-5.0		+48	unwirksam
DNR	+10.0	-10.3	-50.1		-20	unwirksam
VCR	+80.2	+12.4	-10.0		+24	unwirksam
ADR	+55.2	+41.6	+25.1		+79	unwirksam
ADR +						
DNIG K1	+5.0	-30.0	-61.4		-54	fraglich
DNIG K2	-5.0	-30.7	-95.0		-55	fraglich
DNIG K3	-7.0	-45.0	-99.6		-81	wirksam
DNIG K4	-8.9	-110.5	-155.7		-199	wirksam
DNIG	+11.7	-15.1	-45.9	-52.4	-83	wirksam

Abbildung 3.4

D 88/210 Antracyclintransport

**Tabelle 3.7**

D 88/210 Einzelwerte (pmol/mg Protein)

Zelldichte	Gesamtaufnahme		Gebunden	
	Kontrolle	+ DNIG	Kontrolle	+ DNIG
1 Mill./ml	348,3	552,2	62,7	411,9
	459,7	780,7	16,7	42,8
	83,9	670,3	3,8	210,3
2 Mill./ml	701,1	738,9	316,2	120,3
	127,1	188,9	10,9	6,4
	308,1	265,4	27,3	21,1
3 Mill./ml	224,7	1125,2	31,7	38,4
	186,6	194,4	22,6	81,1
	84,3	211,7	5,6	60,0

3.2.3 Neuroblastom D 89/177

Patient, A-Nr.: männlich, D 89/177
Geburtsdatum: 17.08.89
Alter bei Diagnosestellung: 1 Woche
Diagnose: Thorakales Neuroblastom, paravertebral, Grad 3 nach Hughes

chronologischer Verlauf:

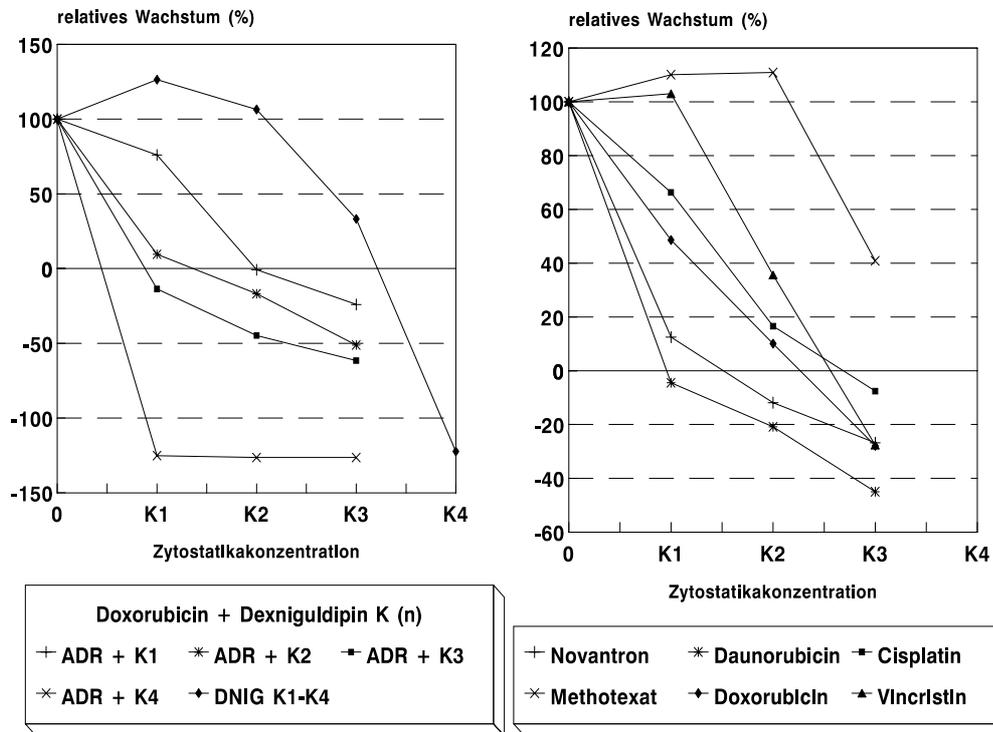
- 08/89: Aufnahme der Mutter wegen V.a. Toxoplasmose (KBR ab 33 SW positiv).
Post partem Toxoplasmoseprophylaxe mit Pyrimethamin und Sulfadiazin,
Verschlechterung des AZ, Röntgen Thorax: 1,7 x 1 cm messende
Raumforderung im rechten Lungenspitzenfeld.
- 09/89: Labor: AFP 7960 (1.9.), 1068 (16.9.). HCG, Ferritin und LDH id. Norm
Thorakales CT: Bestätigung der Raumforderung, Kalkablagerung.
MIBG-Szintigraphie: deutlich vermehrte Speicherung im Bereich des TU.
- 11.09.89: Tumorresektion , **Gewebe für Zellkultur**
- Post-OP: RÖ-MDP: Pylorushypertrophie, Therapie (29.09.): Pyloromyotomie
- 9/89: kein Anhalt für Toxoplasmose, cerebrale Sonographie, MIBG-Kontrolle: OB.
- Verlauf : bis 06/93 dokumentiert: RÖ-Thorax, Sonographie: kein Anhalt für Rezidiv.
Toxoplasmose: negativ; Horner-Syndrom rechts (erstmalig 26.09.89).

Im MPA ergaben sich im Vergleich MDR / non-MDR assoziierte Medikamente keine Unterschiede. Der Antracyclintransport zeigte keine Unterschiede bei der Zytostatikaaufnahme der Zellen, bei 1 Mill/ml ergab sich sogar eine geringere Aufnahme in Anwesenheit von DNIG. Die Patientin ist post-OP tumorfrei und danach ohne Chemotherapie in kompletter Remission. Daher ist eine Aussage zur Chemotherapie nicht möglich. Die immunhistologischen Untersuchungen konnten nicht durchgeführt werden.

Tabelle 3.8 D 89/177: Vergleich der Versuchsergebnisse mit dem Primärassay

Zytostatikum	CDDP	MTX	VCR	ADR
Primärassay	-36	+69	-64	-60
Versuch	+50	+335	+107	+30

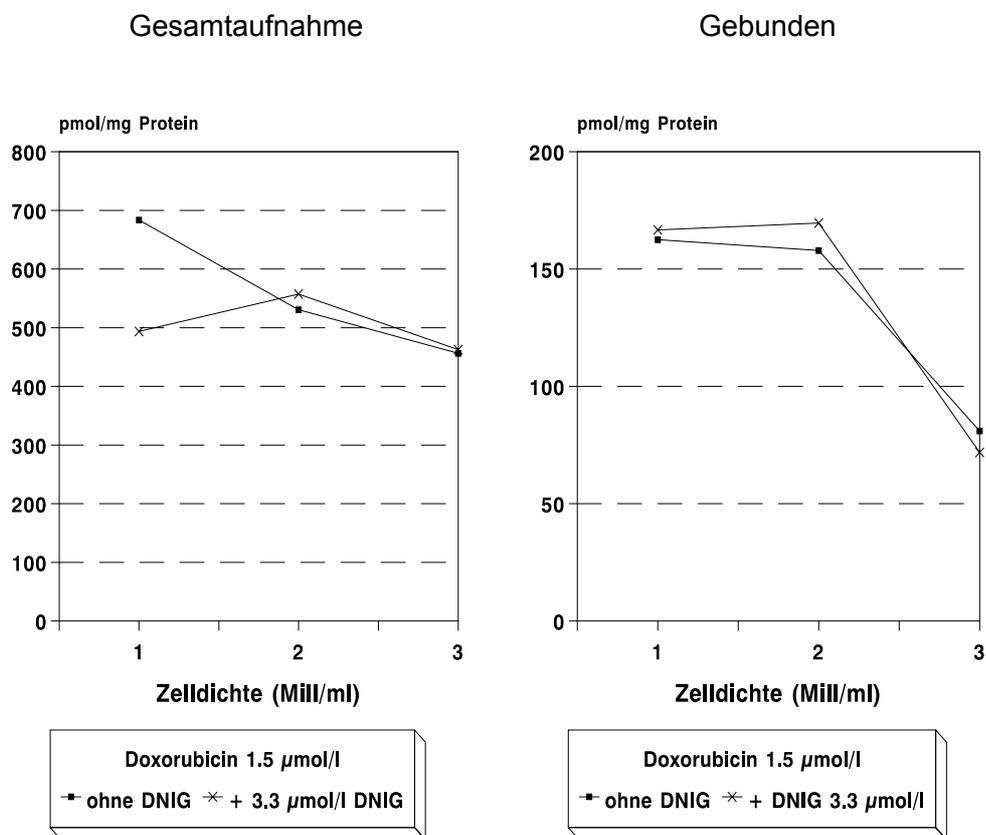
Sensitivitätsindex < -80 = wirksam, zw.-40 und -80 = fraglich, > -40 = unwirksam

Abbildung 3.5 Monolayerproliferationsassay D 89/177**Tabelle 3.9** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur D 89/177 (relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	+66.3	+16.6	-7.6		+50	unwirksam
NOV	+12.5	-11.9	-26.8		-36	unwirksam
MTX	+110.1	+110.9	+40.9		+335	unwirksam
DNR	-4.5	-20.9	-45.0		-63	fraglich
VCR	+103.0	+35.6	-27.7		+107	unwirksam
ADR	+48.6	+10.1	-27.9		+30	unwirksam
ADR +						
DNIG K1	+76.0	-0.8	-24.0		-1	unwirksam
DNIG K2	+9.6	-16.8	-51.2		-30	unwirksam
DNIG K3	-13.6	-44.8	-61.6		-80	wirksam
DNIG K4	-125.2	-126.4	-126.4		-226	wirksam
DNIG	+126.4	+106.4	+33.2	-122.4	+59	unwirksam

Abbildung 3.6

D 89/177 Antracyclintransport

**Tabelle 3.10**

D 89/177 Einzelwerte (pmol/mg Protein)

Zelldichte	Gesamtaufnahme		Gebunden	
	Kontrolle	+ DNIG	Kontrolle	+ DNIG
1 Mill./ml	683,6	475,7	159,8	162,7
	696,2	493,7	162,5	179,6
	554,4	488,2	166,2	166,7
2 Mill./ml	497,3	525,7	141,5	138,9
	530,6	568,1	157,9	169,6
	558,6	557,4	168,9	158,0
3 Mill./ml	437,5	462,7	73,0	71,8
	487,0	496,4	89,2	81,1
	456,4	448,0	81,0	55,0

3.2.4 Nephroblastom A 90/192

Patient, A-Nr.: weiblich, A 90/192
Geburtsdatum: 23.01.1985
Alter bei Diagnosestellung: 5 3/4 Jahre
Diagnose: Nephroblastom links, Stadium 2 / T2, N0, M0

chronologischer Verlauf:

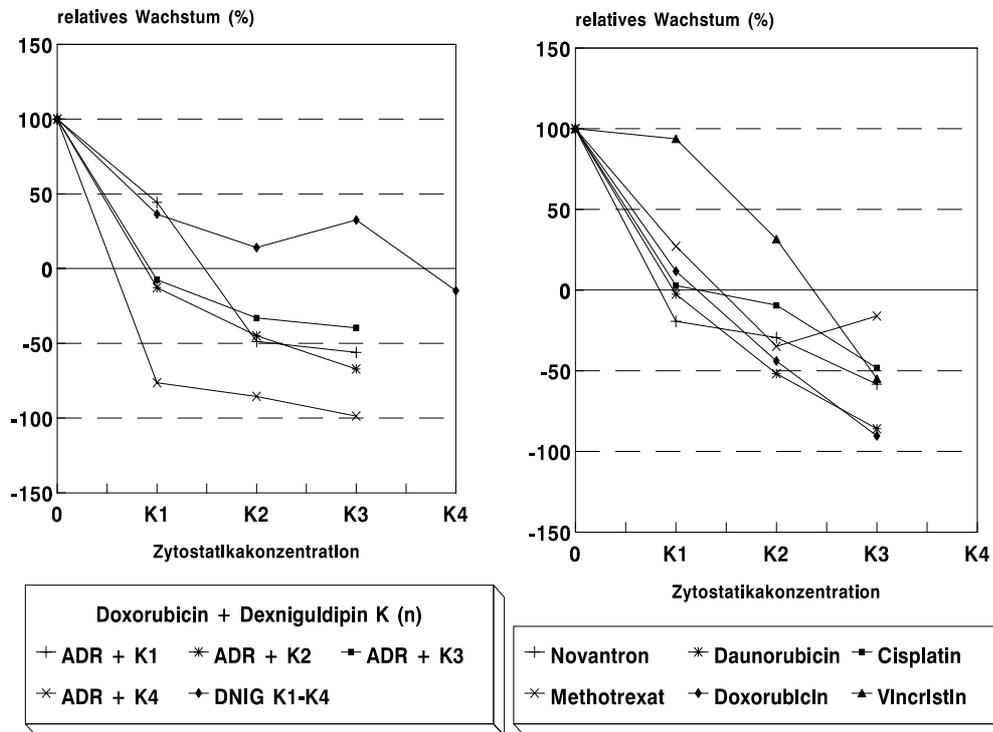
- 27.10.90: Bauchschmerzen, 38,5 °C Temperatur, Makrohämaturie, Einweisung Kinderkrankenhaus Altona
- 28.10.90: Aufnahmebefund: tastbarer Tumor im linken Oberbauch, Sonographie: Raumforderung, V.a. Wilmstumor, Überweisung nach Eppendorf
- 29.10.90: Verifizierung der Diagnose:
- Sonographie, Röntgen, i.v.-Urogramm, CT Abdomen
- 30.10.- 22.11.90 Chemotherapie: Vincristin, Actinomycin D (SIOP 9/GPO)
- 11/90: Zytostatikainduzierte Thrombopenie (Substitution); Steroidtherapie
- 05.12.90: Tumornephrektomie links, **Gewebe für Zellkultur**
- 12/90-06/91 Chemotherapie: Vincristin, Actinomycin D, Doxorubicin
- bis 1993: Verlaufskontrollen: Sonographie, Röntgen (Abdomen & Thorax)

Im MPA waren alle Medikamente ab der niedrigsten eingesetzten Konzentration wachstumshemmend wirksam. Es gab keinen Unterschied in der Wirkung zwischen MDR-Medikamenten und anderen. Der Krankheitsverlauf ist CR. Die primäre Assay-Voraussage ergab: ACD wirksam, ADR fraglich, VCR unwirksam. Es handelte sich um vorbehandeltes Gewebe. Vermutlich ergibt sich eine richtig positive Korrelation. Durch mangelndes Wachstum waren keine Transportuntersuchungen möglich. In der Immunhistologie waren die Zellen PGP-positiv mit JSB-1.

Tabelle 3.11 D 90/192: Vergleich der Versuchsergebnisse mit dem Primärassay

Zytostatikum	CDDP	MTX	VCR	ADR
Primärassay	-51	+12	+71	-64
Versuch	-13	-49	+44	-134

Sensitivitätsindex < -80 = wirksam, zw. -40 und -80 = fraglich , > -40 = unwirksam

Abbildung 3.7 Monoproliferationsassay A 90/192**Tabelle 3.12** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur A 90/192 (relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	+2.8	-9.4	-48.3		-13	unwirksam
NOV	-19.4	-29.4	-58.3		-41	fraglich
MTX	+27.2	-34.9	-16.1		-49	fraglich
DNR	-2.5	-51.8	-86.0		-72	fraglich
VCR	+93.8	+31.6	-54.9		+44	unwirksam
ADR	+11.7	-44.0	-90.4		-61	fraglich
ADR +						
DNIG K1	+44.3	-48.8	-56.1		-77	fraglich
DNIG K2	-12.8	-44.9	-76.2		-71	fraglich
DNIG K3	-7.5	-33.1	-39.7		-52	fraglich
DNIG K4	-76.4	-85.6	-98.7		-136	wirksam
DNIG	+36.4	+14.1	+32.5	-14.8	+51	unwirksam

3.2.5 Neuroblastom A 91/014

<u>Patient , A-Nr.:</u>	männlich, A 91/014
<u>Geburtsdatum:</u>	08.11.89
<u>Alter bei Diagnosestellung:</u>	15 Monate
<u>Diagnose:</u>	Neuroblastom, Grad 3 nach Hughes, T3,N0,M0

chronologischer Verlauf:

- ab 11/90: rezidivierende Infekte und Fieberschübe
- Februar 91: palpabler abdomineller Tumor; daraufhin Kinderkrankenhaus Altona
- 11.02.91: Sonographie: 7,5 x 6,5 cm großer Tumor im Bereich der rechten Nebenniere
- 12.-14.02.91: Labor: LDH: 1251 ng/ml, NSE: 102 ng/ml, Ferritin: 229 ng/ml.
Szintigraphie (MIBG), CT des Abdomen, IV-Urogramm, Röntgen, Sonographie, Knochenszintigraphie. Lymphome linke Nierenvene.
- 15.02.91: Probebiopsie, Broviac-Implantation; Histologie: NBL Grad 3 nach Hughes
Gewebe für Zellkultur. Chemotherapie Block 1: VCR, DTIC, IFO, ADR
- 03 u. 04/91 Chemotherapie Block 2: Cisplatin, VP 16, Vindesin; Block 1 (s.o.)
- 16.04.91: Einweisung mit schwerem Lungengerüstumbau, Rechtsherzbelastung, Pleura- und Perikardergüssen (Echocardiographie, Röntgen).
- 22.05.91: Tumorextirpation, TU Kirschgroß (intraoperativ)
- bis 07/91: Sono, Röntgen, CT in der Verlaufskontrolle: komplette Remission
- 26.07.91: reduzierter AZ, Fieber, Brillenhämatom, Protusio Bulbi bds: Rezidiv mit Befall von Knochenmark, Schädelbasis und occipitaler Calotte. Labor: LDH 12200 ng/ml, Thrombo und Leukopenie. Stadium 4, keine weitere Therapie
- 04.09.91: Tod des Patienten

Im MPA wirken alle Medikamente ab K2 zytotoxisch. Es handelt sich um nicht vorbehandeltes Tumorgewebe, wobei im 1. Test ADR, VCR, VP 16 wirksam waren. Primär erfolgte gutes Ansprechen auf die Therapie (CR). Postoperativ entwickelten sich unter Chemotherapie Metastasen und der Patient verstarb. Primär richtig positives Ergebnis. Wegen mangelndem Wachstum war der Antracyclintransport nicht zu untersuchen. Die Immunhistologie ergab: PGP positiv mit JSB-1.

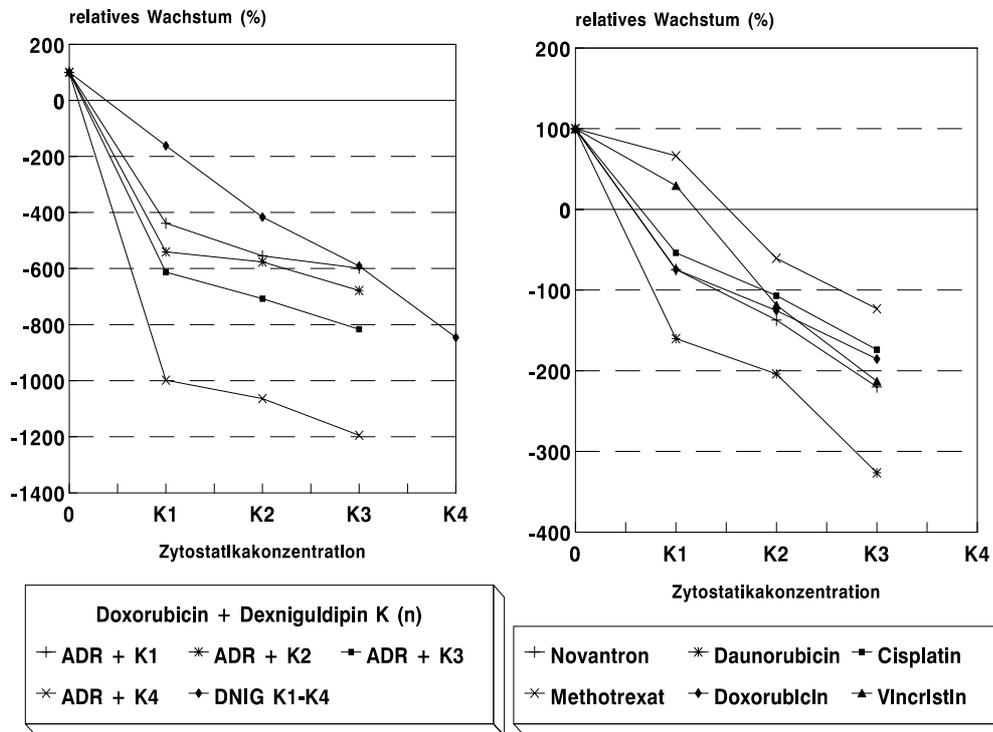
Tabelle 3.13 A 91/014: Vergleich der Versuchsergebnisse mit dem Primärassay

Zytostatikum	VCR	ADR
Primärassay	-117	-84
Versuch	-149	-158

Sensitivitätsindex < -80 = wirksam, zw. -40 und -80 = fraglich, > -40 = unwirksam

Abbildung 3.8

Monolayerproliferationsassay A 91/014

**Tabelle 3.14** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur A 91/014 (relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	-53.8	-106.9	-173.9		-135	wirksam
NOV	-74.5	-137.0	-220.2		-173	wirksam
MTX	+66.5	-60.7	-123.1		-77	fraglich
DNR	-160.1	-204.0	-326.5		-257	wirksam
VCR	+29.5	-118.5	-213.2		-149	wirksam
ADR	-74.5	-125.4	-185.5		-158	wirksam
ADR +						
DNIG K1	-483.3	-554.6	-598.3		-601	wirksam
DNIG K2	-540.1	-576.4	-678.2		-624	wirksam
DNIG K3	-612.8	-707.4	-816.5		-766	wirksam
DNIG K4	-998.3	-1063.8	-1194.7		-1152	wirksam
DNIG	-161.9	-416.3	-590.9	-845.5	-640	wirksam

3.2.6 Nephroblastom A 91/041

Patient, A-Nr.: männlich, A 91/041
Geburtsdatum: 01.02.1987
Alter bei Diagnosestellung: 3 Jahre
Diagnose: Nephroblastom, Mischtyp (fokale Anaplasie), T2,N1,M0

chronologischer Verlauf:

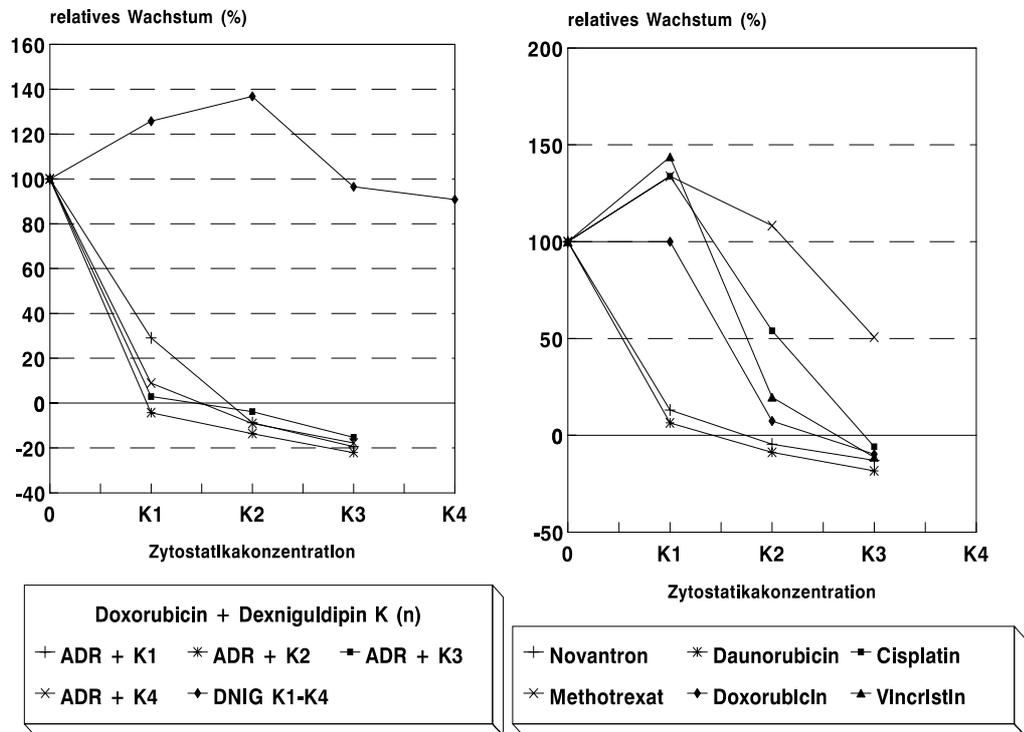
- 25.04.1990: Diagnose: klinische Untersuchung, Sonographie: abd. Lymphknoten
- ab 04/90: Chemotherapie: nach SIOP 9/GPO: Vincristin, Actinomycin D
- 29.05.90: Tumornephrektomie
- 28.06.90: Sonographie, CT: Routinekontrolle: solitäre Lungenmetastase.
Chemotherapie: Vincristin, Actinomycin D, Doxorubicin
- 12.07.90: Metastasektomie
- 02/91: Radiatio: 15 Gy (beide Lungen und TU Bett); zusätzlich 15 Gy auf rechte Zwerchfellkuppe und Sitz der Metastase
- 03/91: Sonographie, CT: abdominelle Metastasen (V.Cava, Bauchwand).
Laparotomie (18.03.), Chemotherapie: Cisplatin, Aclaplastin (22.-26.03.)
Kontrollen: Röntgen-Thorax: pulmonale Rundherde
- 22.04.91: Thorakotomie, **Gewebe für Zellkultur**
- 05/91: Röntgen & Sonographie (27.05.): Lungenmetastasen, Lymphome; Progredienz
- 20.07.91: Tod des Patienten

Im MPA wurde unter DNIG bei allen Konzentrationen ungehemmte Proliferation beobachtet. Alle anderen Medikamente wirken zytotoxisch. Im Vergleich MDR / non MDR Medikamente ergab sich kein Unterschied. Im Transportassay ergab sich das typische Bild eines MDR-Transportsystems: Eine Zunahme der Transportkapazität von 3 bis 1 Mill. Zellen/ml. Der klinische Verlauf war PD, im primären MPA wurde Resistenz gegen ADR, CDDP, ACD, Carboplatin und VCR dargestellt. Nach der Austestung erfolgte keine weitere Chemotherapie. Das Gewebe war vorbehandelt. In der Immunhistologie war die Markierung mit JSB-1 positiv.

Tabelle 3.15 A 91/041: Vergleich der Versuchsergebnisse mit dem Primärassay

Zytostatikum	VCR	ADR
Primärassay	+662	+34
Versuch	+76	+29

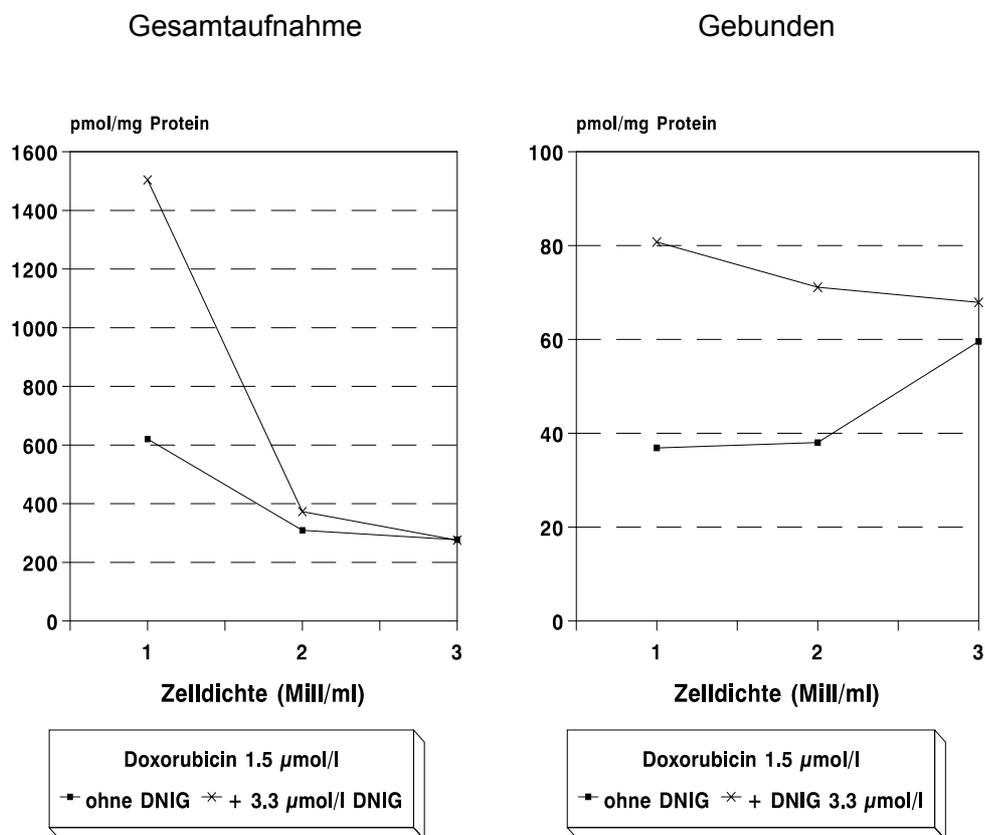
Sensitivitätsindex < -80 = wirksam, zw. -40 und -80 = fraglich, > -40 = unwirksam

Abbildung 3.9 A 91/041 Monolayerproliferationsassay**Tabelle 3.16** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur A 91/041 (relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	+133.8	+54.0	-5.9		+209	unwirksam
NOV	+13.0	-4.6	-13.0		-18	unwirksam
MTX	+133.8	+108.3	+50.7		+420	unwirksam
DNR	+6.4	-8.8	-18.4		-34	unwirksam
VCR	+143.8	+19.6	-11.4		+76	unwirksam
ADR	+100.0	+7.4	-9.8		+29	unwirksam
ADR +						
DNIG K1	+29.1	-8.8	-19.4		-38	unwirksam
DNIG K2	-4.3	-13.6	-22.1		-58	fraglich
DNIG K3	+2.9	-3.8	-15.3		-16	unwirksam
DNIG K4	+8.9	-9.1	-17.8		-39	unwirksam
DNIG	+125.7	+136.8	+96.5	+90.8	+414	unwirksam

Abbildung 3.10

D 91/041 Antracyclintransport

**Tabelle 3.17**

A 91/041 Einzelwerte (pmol/mg Protein)

Zelldichte	Gesamtaufnahme		Gebunden	
	Kontrolle	+ DNIG	Kontrolle	+ DNIG
1 Mill./ml	911,3	842,8	30,9	40,3
	620,5	1503,9	88,3	80,8
	444,7	1542,9	36,9	83,2
2 Mill./ml	294,8	769,3	40,9	78,1
	393,5	353,7	38,0	47,3
	309,5	373,1	30,6	71,1
3 Mill./ml	144,9	257,4	54,6	67,9
	277,5	275,3	63,4	86,0
	291,6	286,9	59,6	60,0

3.2.7 Neuroblastom A 91/049

<u>Patient, A-Nr.:</u>	männlich, A 91/049
<u>Geburtsdatum:</u>	11.05.1991
<u>Alter bei Diagnosestellung:</u>	10 Tage
<u>Diagnose:</u>	niedrig differenziertes Neuroblastom Stadium 3

chronologischer Verlauf:

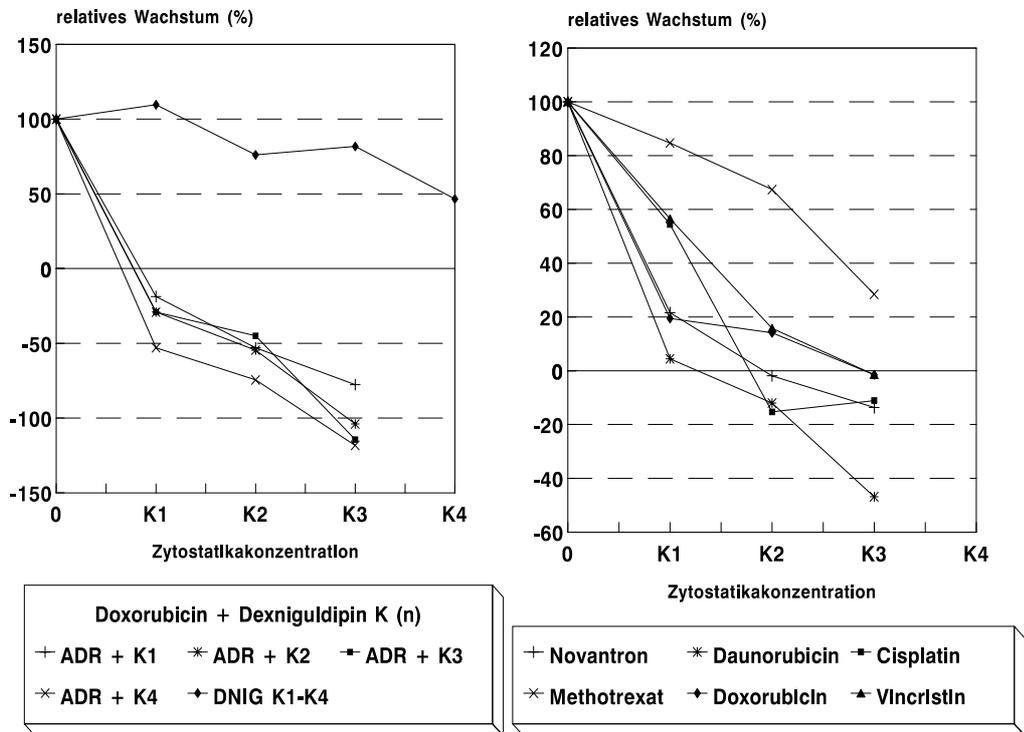
- 05/91: kurzzeitige Apnoe mit Flush, Kinderarzt: Überweisung AK Heidberg, Sono, CT: Raumforderung von 7 x 7 x 5 cm im linken Unterbauch. Überweisung UKE: NMR, CT, Sono: Bestätigung der Befunde
Labor= VMS/HVS i.U.: 186.2 u. 132 mmol/mol Ferritin: 684, LDH: 522
- 29.05.91: Laparotomie mit PE, **Gewebe für Zellkultur**
- 06/91: Chemotherapie Block N1: Cyclophosphamid, VCR, VP 16
- 07/91: 2 x Block N2: VCR, VP 16, Carboplatin
- 09/91: Block N3: Cyclophosphamid, VCR, ADR
NMR, Sono: Abnahme der Tumorgöße unter Therapie auf 4.5 x 4 x 3 cm
- 19.10.91: Tumorextirpation
- Kontrollen: bis 05/93: Sono erst monatlich, dann 2 mon.: kein Rezidiv
03/93: CT: kein Rezidiv, NSE: 01, 03, 09/92 und 03/93: Normalwerte
VMS/HVS i.U.: 06, 09, 12/92 und 01, 03, 05/93: Normwerte

Im MPA waren alle Medikamente hemmend wirksam (DNIG K1: fraglicher Artefakt). Eine zytotoxische Wirkung ergab sich bei unterschiedlichen Konzentrationen. Es war kein Wirkunterschied zwischen MDR/non-MDR Medikamenten darzustellen. Der Antracyclintransport wurde aufgrund mangelndem Wachstums bei 1 Mill. Zellen/ml durchgeführt, daher wurde auf eine grafische Darstellung verzichtet. Ein Unterschied in der Zytostatikaaufnahme ist nicht sichtbar. Der klinische Verlauf ist CR. Das Tumorgewebe war nicht vorbehandelt. Ergebnis: ADR fraglich, VCR u. VP 16 wirksam. Präoperativ erfolgte eine Chemotherapie. Ergebnis Richtig Positiv. Immunhistologie: PGP negativ.

Tabelle 3.18 A 91/049: Vergleich der Versuchsergebnisse mit dem Primärassay

Zytostatikum	VCR	ADR
Primärassay	-147	-50
Versuch	+40	+35

Sensitivitätsindex < -80 = wirksam, zw. -40 und -80 = fraglich, > -40 = unwirksam

Abbildung 3.11 A 91/049 Monolayerproliferationsassay**Tabelle 3.19** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur A 91/049 (relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	+54.4	-15.3	-11.1		-38	unwirksam
NOV	+21.6	-1.9	-13.7		-5	unwirksam
MTX	+84.7	+67.4	+28.4		+169	unwirksam
DNR	+4.4	-12.0	-46.9		-30	unwirksam
VCR	+56.5	+15.8	-1.5		+40	unwirksam
ADR	+19.5	+14.1	-1.5		+35	unwirksam
ADR +						
DNIG K1	-18.7	-53.0	-77.7		-95	wirksam
DNIG K2	-29.1	-54.6	-104.0		-98	wirksam
DNIG K3	-29.1	-45.0	-114.4		-81	wirksam
DNIG K4	-53.0	-74.5	-118.3		-134	wirksam
DNIG	+109.6	+76.1	+81.7	+46.6	+147	unwirksam

3.2.8 Teratom A 91/060

Patient, A-Nr.: männlich, A 91/060
Geburtsdatum: 10.09.1991
Alter bei Diagnosestellung: 1 Tag
Diagnose: Suprarenales unreifes Teratom, Grad 3 nach Gonzales/Crussi

chronologischer Verlauf:

- 11.09.91: Bei U1 Palpation eines großen Tumors im rechten Ober/Mittelbauch
- 09/91 Abdomensonographie (11.09.): 7 x 5,5 x 4,5 cm messender Tumor im Bereich der rechten Nierenloge. RÖ-Thorax (12.09.): Kardiomegalie, IV-Urogramm (18.09.): Raumforderung im Bereich des rechten cranialen Nierenpols,

Verdachtsdiagnose: Wilmstumor

- 23.09.91: transabdominelle Tumornephrektomie

Gewebe für Zellkultur

Histologie: Diagnose des Teratoms

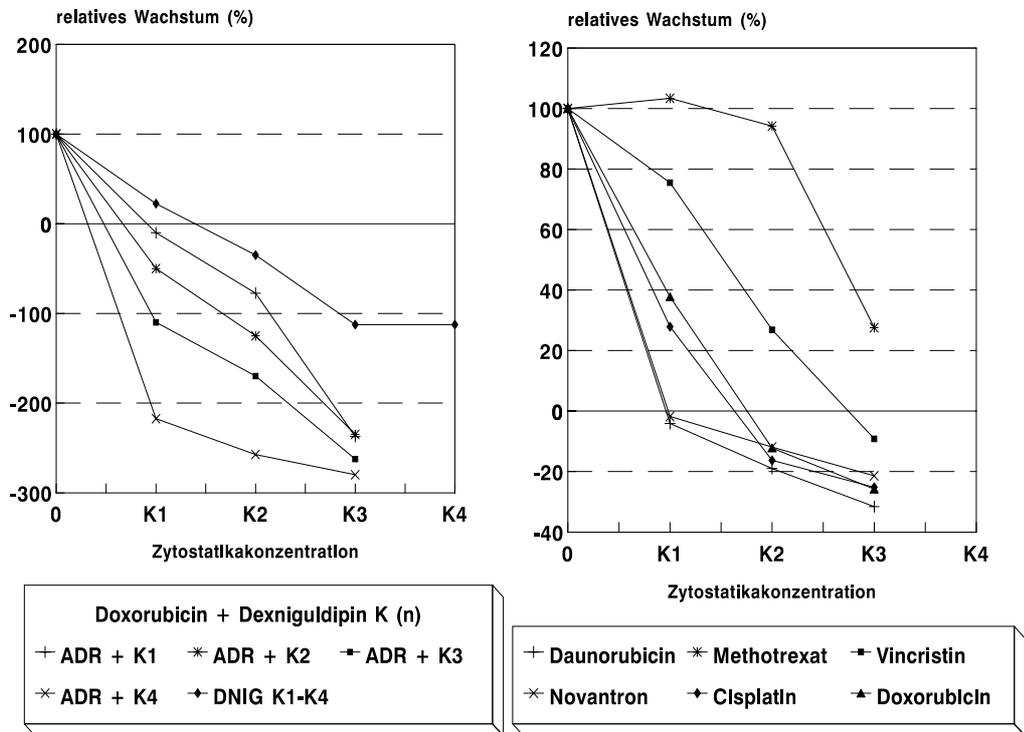
- 91-93 Verlaufskontrollen: Sonographie, Röntgen: erst monatlich, zuletzt 1/2 jährlich: keine Anhalte für ein Rezidiv

Im MPA wirken alle Konzentrationen Wachstumshemmend. Eine zytotoxische Wirkung ergibt sich bei unterschiedlichen Konzentrationen. MDR-assoziierte Medikamente zeigen im Vergleich bessere Wirksamkeit. Im Vergleich zum Vorassay ist VCR wirksamer. Im Antracyclintransport zeigt sich kein Unterschied in der Zytostatikaaufnahme bei DNIG Applikation. Der Patient war postoperativ ohne Chemotherapie Tumorfrei, daher ist keine Vorhersage möglich. Der Verlauf ist CR.

Tabelle 3.20 A 91/060: Vergleich der Versuchsergebnisse mit dem Primärassay

Zytostatikum	VCR	ADR
Primärassay	-65	0
Versuch	+95	-43

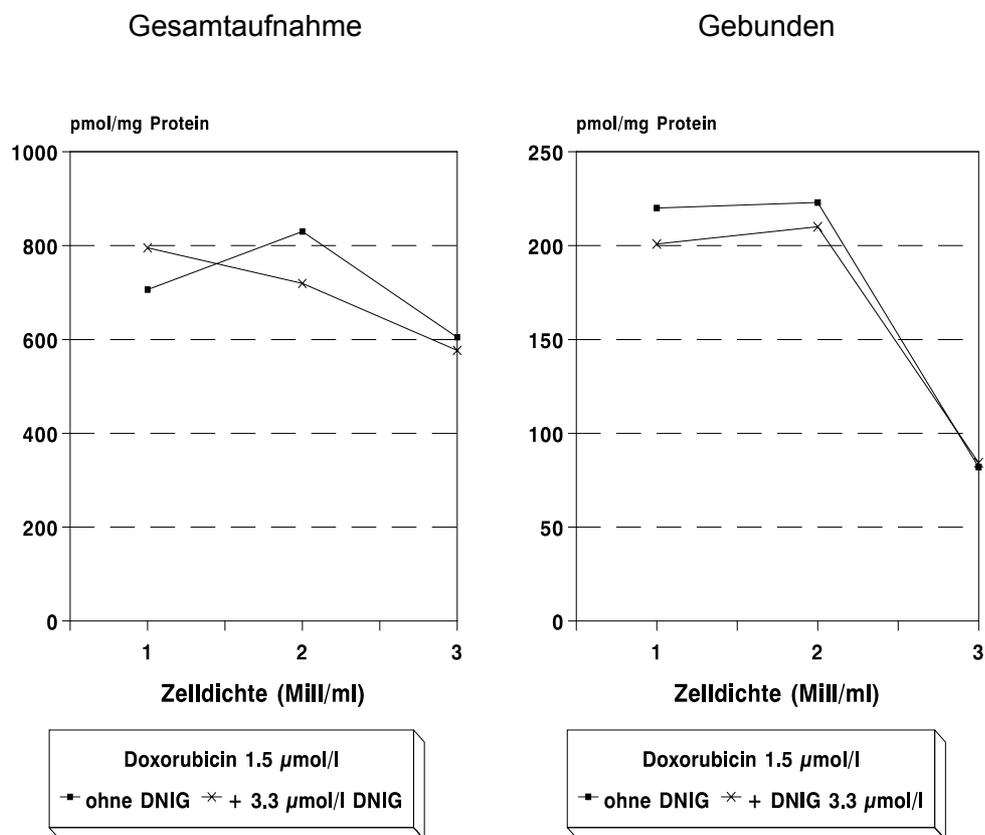
Sensitivitätsindex < -80 = wirksam, zw. -40 und -80 = fraglich, > -40 = unwirksam

Abbildung 3.12 A 91/060 Monolayerproliferationsassay**Tabelle 3.21** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur A 91/060 (relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	+27.9	-16.3	-25.2		-58	fraglich
NOV	-1.8	-11.9	-21.4		-42	fraglich
MTX	+103.4	+94.2	+27.6		+333	unwirksam
DNR	-4.1	-19.0	-31.6		-67	fraglich
VCR	+75.5	+26.9	-9.2		+95	unwirksam
ADR	+37.8	-12.2	-25.8		-43	fraglich
ADR +						
DNIG K1	-10.0	-77.4	-237.4		-104	wirksam
DNIG K2	-50.0	-125.0	-234.9		-168	wirksam
DNIG K3	-109.9	-169.9	-262.4		-229	wirksam
DNIG K4	-217.4	-257.4	-279.9		-346	wirksam
DNIG	+22.5	-35.0	-112.5	-112.5	-151	wirksam

Abbildung 3.13

A 91/060 Antracyclintransport

**Tabelle 3.22** A 91/060 Einzelwerte (pmol/mg Protein)

Zelldichte	Gesamtaufnahme		Gebunden	
	Kontrolle	+ DNIG	Kontrolle	+ DNIG
1 Mill./ml	697,3	795,3	252,7	232,9
	882,2	840,2	190,3	200,8
	706,2	707,6	220,1	150,1
2 Mill./ml	830,0	719,5	212,3	183,6
	953,5	670,9	383,9	220,6
	829,9	918,8	222,9	210,1
3 Mill./ml	664,3	684,3	82,0	100,3
	604,7	576,8	97,7	84,3
	633,4	453,9	53,6	73,3

3.2.9 Neuroblastom A 92/005

Patient, A-Nr.: weiblich, A 92/005
Geburtsdatum: 06.08.90
Alter bei Diagnosestellung: 14 Monate
Diagnose: niedrig differenziertes Neuroblastom, Grad 3 nach Hughes

chronologischer Verlauf:

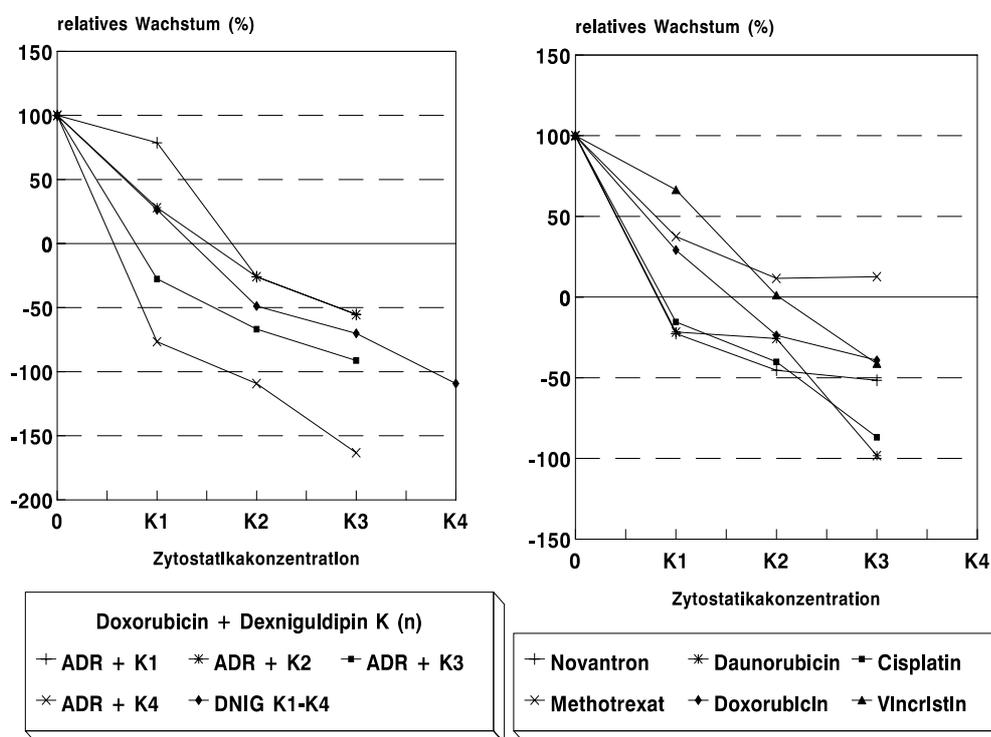
- 10/91: tastbarer Tumor im linken Oberbauch. Sonographie: Vd. a. Neuroblastom. UKE: Sono: 9 x 7,5 x 6,5 große Raumforderung im linken Retroperitoneum, CT Verkalkung und KM-Anreicherung, MBIG-Szintigraphie: intensiv speichernder Tumor, keine Metastasen. Labor: GOT 33 IE/l, Fe 7,7 µmol/l, LDH 440 U/l, VMS und HVS 86,9 bzw. 206,36 mmol/mol Kreatinin, AFP 5,7 kU/l, HCG 1,9 IU/l, Ferritin 18 µg/l
- 22.10.91: Chemotherapie (NB 90): Cisplatin, VP 16, Vindesin (Block N1). Ifosfamid, DTIC, Adriamycin, Vincristin (Block N2)
- 04.12.91: Tumor bei klinischer Untersuchung nicht mehr palpabel
- 27.12.91: N1-Block NB 90
- 01/92: Sono, CT: Rückgang der Tumorgöße auf 3 x 3 x 4 cm
Labor: VMS, HVS: 8,25 und 11,86 mmol/mol, NSE 26,9 ng/ml
- 06.02.92: Tumorextirpation (6 x 3 x 3,5 cm), **Gewebe für Zellkultur**
- Verlaufskontrolle: Labor: NSE (04 und 06/92), Sono (04, 06, 09/92, 01 und 05/93): o.B.

Im MPA erreichen alle Wirkstoffe ab K2 zytotoxische Wirkung. Im Vergleich zwischen MDR-assoziierten und anderen Pharmaka ist kein Unterschied sichtbar. Im Vergleich zum Vorassay ist VCR gleichbleibend unwirksam, sowie ADR fraglich. Der Transportassay wurde bei 2 u. 1 Mill. Zellen/ml durchgeführt. Es resultiert ein MDR typisches Bild mit deutlichem Unterschied bei 1 Mill. Zellen und geringem Unterschied bei 2 Mill. Zellen/ml. Die Patientin ist postoperativ tumorfrei nach Chemotherapie (richtig positive Vorhersage). Der Verlauf ist CR. Assay (vorbehandelt): VCR, ADR unwirksam, VP 16 wirksam. In der Immunhistologie ist PGP positiv mit JSB-1.

Tabelle 3.23 A 92/005: Vergleich der Versuchsergebnisse mit dem Primärassay

Zytostatikum	VCR	ADR
Primärassay	-18	-101
Versuch	+2	-47

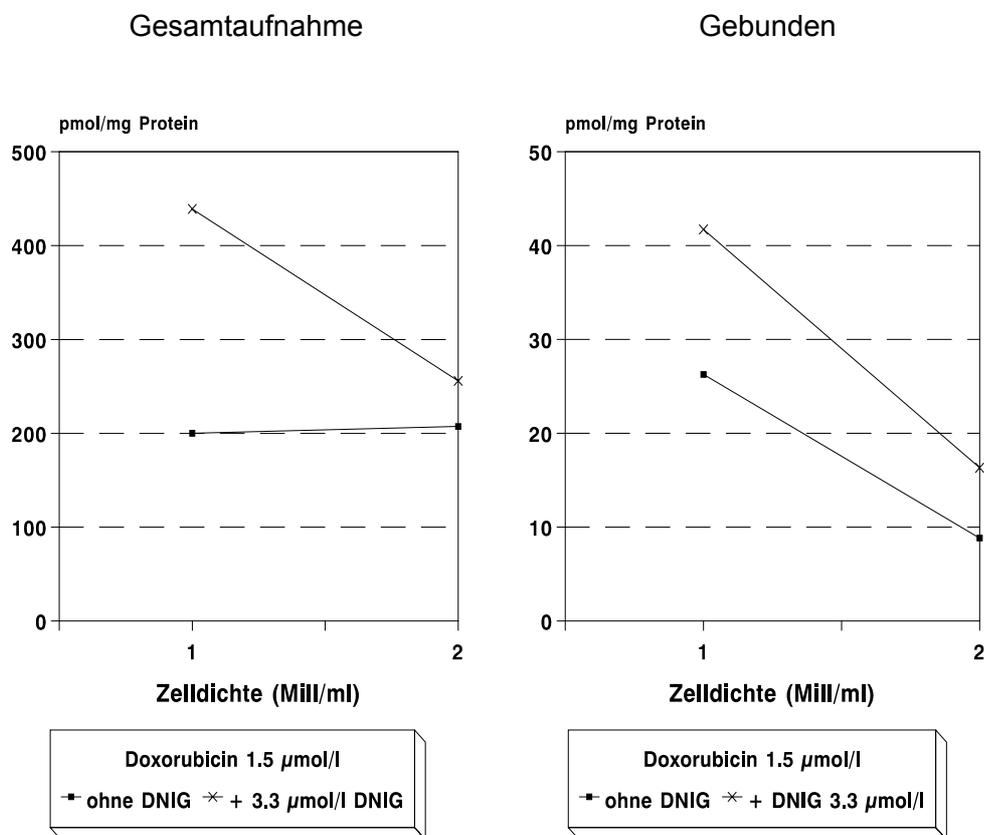
Sensitivitätsindex < -80 = wirksam, zw. -40 und -80 = fraglich, > -40 = unwirksam

Abbildung 3.14 A 92/005 Monolayerproliferationsassay**Tabelle 3.24** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur A 92/005 (relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	-15.4	-40.2	-86.9		-79	fraglich
NOV	-22.6	-45.4	-51.6		-89	wirksam
MTX	+37.5	+11.6	+12.6		+23	unwirksam
DNR	-21.6	-25.7	-98.3		-51	fraglich
VCR	+66.5	+1.2	-41.3		+2	unwirksam
ADR	+29.2	-23.7	-39.2		-46	fraglich
ADR +						
DNIG K1	+78.7	-25.9	-55.4		-42	fraglich
DNIG K2	+28.0	-25.9	-55.4		-42	fraglich
DNIG K3	-27.6	-66.8	-91.3		-108	wirksam
DNIG K4	-76.6	-109.3	-163.3		-176	wirksam
DNIG	+26.4	-48.8	-70.1	-109.3	-113	wirksam

Abbildung 3.15

A 92/005 Antracyclintransport

**Tabelle 3.25** A 92/005 Einzelwerte (pmol/mg Protein)

Zelldichte	Gesamtaufnahme		Gebunden	
	Kontrolle	+ DNIG	Kontrolle	+ DNIG
1 Mill./ml	200,1	453,9	26,3	56,0
	264,9	439,1	21,6	31,6
	146,2	363,2	28,2	41,7
2 Mill./ml	207,4	255,8	8,8	16,3
	204,6	248,9	37,7	14,2
	291,6	288,4	4,4	40,8

3.2.10 Neuroblastom A 92/037

Patient, A-Nr.: männlich, A 92/037
Geburtsdatum: 11.05.1978
Alter bei Diagnose / Rezidiv 8 Jahre / 13,5 Jahre
Diagnose: abdominelles Neuroblastom Grad 3 (Rezidiv Grad 4)

chronologischer Verlauf:

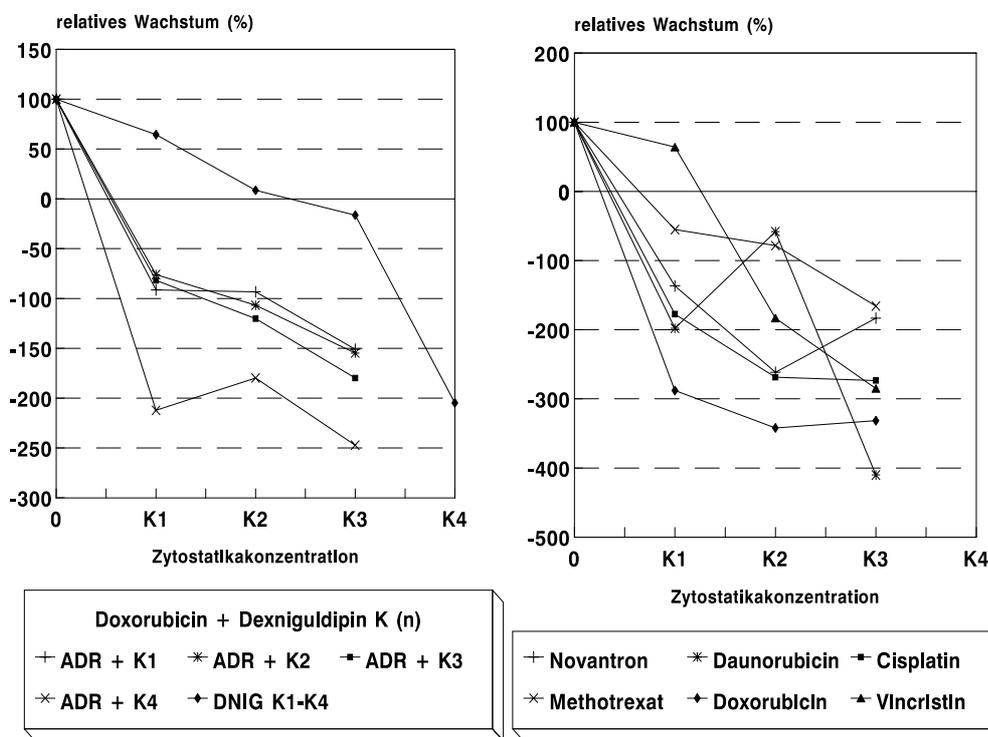
- 08/86: Kinderarzt: palpabler Tumor, UKE. Röntgen, CT: 15 x 10 cm großer Tumor
- 21.08.86: Tumorrevision
- 28.08. bis 04.09.86: Chemotherapie (NB 85), 2 x Block N1: ADR, Cyclophosphamid, VCR, DTIC
2 x Block N2: Endoxan, Cisplatin, VM 26. Tumorreste (Sono/CT)
- 02/87: Radiatio 30 Gy, danach alle Kontrollen ohne Befund
- 10/91: Sono, CT: Raumforderung 2.5 x 5 cm, MBIG-Szintigraphie: V.a. Rezidiv.
Labor= VMS/ HVS i.U.: 14.2 und 12.3 mmol/mol. LDH: 265, Ferritin: 110
- 11 und 12/91: 131-J-MBIG Therapie
- 01/92: im CT-Befund leichter Tumorregress, Labor= VMS/ HVS: 7.4 und 8.4
mmol/mol. Chemotherapie: Melphalan, Carboplatin
- 19.03.92: Tumorrevision
- 04 - 07/92: Chemotherapie: Melphalan, Carboplatin. MBIG-Szinti / CT: Tumorrest
- 13.07.92: Tumorrevision, **Gewebe für Zellkultur**
- bis 11/92: weiterhin Chemotherapie mit Melphalan und Carboplatin
- 01 02 und 06/93: Szintigraphie, CT: fraglich minimale Tumorreste, weiterer Verlauf steht aus.

Im MPA wirken VCR ab K2 und DNIG ab K3 zytotoxisch, alle anderen Medikamente ab K1. Die MDR-assoziierten Zytostatika sind fraglich besser wirksam. Im Vergleich zum Vorassay sind VCR u. ADR gleich wirksam. Im Transportassay ergibt sich bei 2 Mill. kein Unterschied, sowie bei 1 Mill. Zellen ein großer relativer Unterschied, dies entspricht einem typischen MDR-Bild (vorbehandeltes Gewebe). Der klinische Verlauf unter Chemotherapie und mehrmaliger Tumorrevision ist PR. Im Primärassay wurde vorbehandeltes Gewebe untersucht: unwirksam= Endoxan, wirksam= VCR, ADR, Melphalan (Ergebnis richtig positiv). Die Immunhistologie ergab PGP positiv (JSB-1).

Tabelle 3.26 A 92/037: Vergleich der Versuchsergebnisse mit dem Primärassay

Zytostatikum	VCR	ADR
Primärassay	-217	-294
Versuch	-225	-420

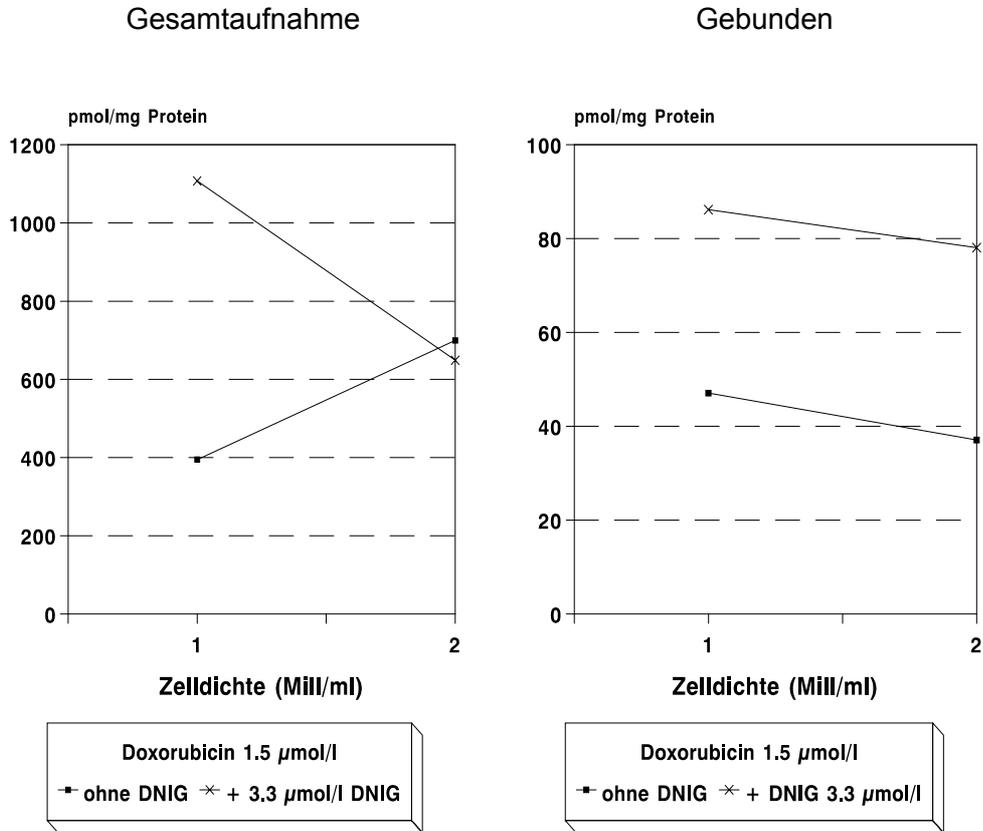
Sensitivitätsindex < -80 = wirksam, zw. -40 und -80 = fraglich, > -40 = unwirksam

Abbildung 3.16 A 92/037 Monolayerproliferationsassay**Tabelle 3.27** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur A 92/037 (relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	-177.5	-268.8	-273.5		-330	wirksam
NOV	-136.8	-261.8	-183.3		-322	wirksam
MTX	-55.3	-78.5	-165.9		-97	wirksam
DNR	-197.9	-58.2	-410.3		-72	fraglich
VCR	+64.0	-183.3	-285.1		-225	wirksam
ADR	-288.0	-342.2	-331.7		-421	wirksam
ADR +						
DNIG K1	-91.4	-93.3	-151.0		-129	wirksam
DNIG K2	-76.0	-106.8	-154.8		-148	wirksam
DNIG K3	-81.8	-120.2	-179.8		-166	wirksam
DNIG K4	-212.5	-235.6	-247.2		-326	wirksam
DNIG	+64.4	+8.6	-16.4	-204.8	-23	unwirksam

Abbildung 3.17

A 92/037 Antracyclintransport

**Tabelle 3.28** A 92/037 Einzelwerte (pmol/mg Protein)

Zelldichte	Gesamtaufnahme		Gebunden	
	Kontrolle	+ DNIG	Kontrolle	+ DNIG
1 Mill./ml	284,1	1274,5	47,1	91,5
	627,7	1107,3	32,8	86,2
	394,8	840,8	66,2	71,9
2 Mill./ml	416,5	591,9	26,9	78,1
	703,1	1351,4	43,8	124,9
	699,7	649,1	37,1	73,8

3.2.11 Neuroblastom A 92/041

Patient, A-Nr.:	weiblich, A 92/041
Geburtsdatum:	07.08.82
Alter bei Diagnosestellung:	10 Jahre
Diagnose:	abdominelles Neuroblastom, Stadium 4

chronologischer Verlauf:

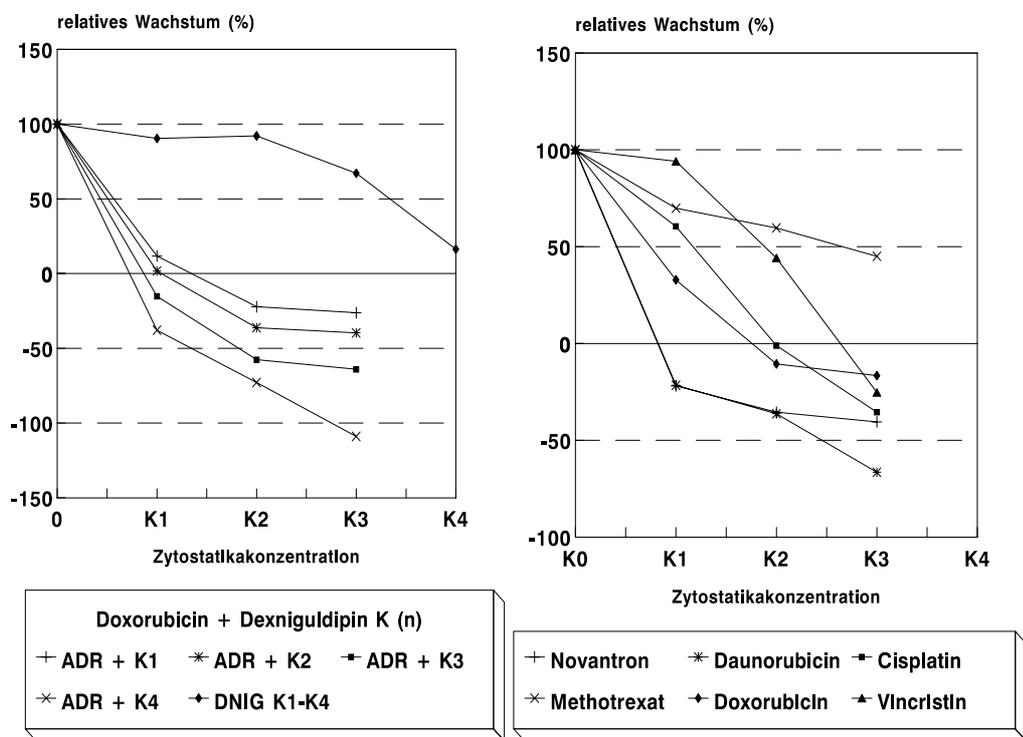
- 03/92: Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Schwäche und Schwindel. Hohe BSG, Anämie. Sono: retrocavale Raumforderung 4,5 x 4,5 x 12,5 cm. Röntgen, CT, MBIG: Skelettbefall, Befall der Orbita, Knochenmarkbefall. Labor = NSE: 867 ng/ml, LDH 2660, VMS/HVS im Urin: 14,34 u. 70 mmol/mol Kreatinin
- bis 07/92: Chemotherapie (NB 90): N1 = Cisplatin, Vindesin, VP 16 (Leukopenie) N2 = Vincristin, DTIC, IFO, Adriamycin (cerebraler Krampfanfall). Wiederholen der Blöcke N1 und N2. Unter Therapie Rückgang des Tumors (Sono, CT, RÖ: 4,3 x 2,5 x 7,2 cm). Labor = NSE: 7,3, Ferritin: 540, VMS/HVS: 1,86 / 3,99, LDH: 273
- 23.07.92: Tumorextirpation, **Gewebe für Zellkultur**
Histologie: NBL Grad 2 nach Hughes, mittelgradig differenziert
- bis 11/92: weiterhin Chemotherapie: 28.07.: N1, 29.09.: N2, darunter Leukopenie und Fieber
- 09 u. 10/92: Röntgen, CT, Sono, MBIG : fragliche Reste des Tumors paravertebral
- 19.01.93: Tumornachresektion mit Adrenaektomie der rechten Nebenniere
- 03/93: Knochenmarktransplantation, Konditionierung mit Melphalan, Carboplatin, VP 16
- 05 u. 06/93: Radiatio 18 Gy des Tumorbettes. Weiteres Procedere steht zum Zeitpunkt der Auswertung noch aus

Im MPA wurde eine zytostatische Wirkung bei VCR ab K3, ansonsten ab K2 gemessen. MDR- Medikamente und nicht assoziierte zeigten keinen Wirkunterschied. Im Vergleich zum Vorassay sind VCR und ADR von gleichbleibender Wirkung. Der Transportassay zeigt ein schwaches Transportsystem: Bei 2 Mill. Zellen/ml kein Unterschied, 1 Mill./ml geringer Unterschied. Klinischer Verlauf unter Chemotherapie und mehrmaliger OP primär MR. Das weitere Procedere steht noch aus. Tumorgewebe (vorbehandelt) getestet: ADR + VCR unwirksam, VP 16 fraglich. Das Ergebnis ist nicht zu beurteilen. In der Immunhistologie war PGP positiv mit JSB-1.

Tabelle 3.29 A 92/041: Vergleich der Versuchsergebnisse mit dem Primärassay

Zytostatikum	VCR	ADR
Primärassay	+1	-22
Versuch	+107	-26

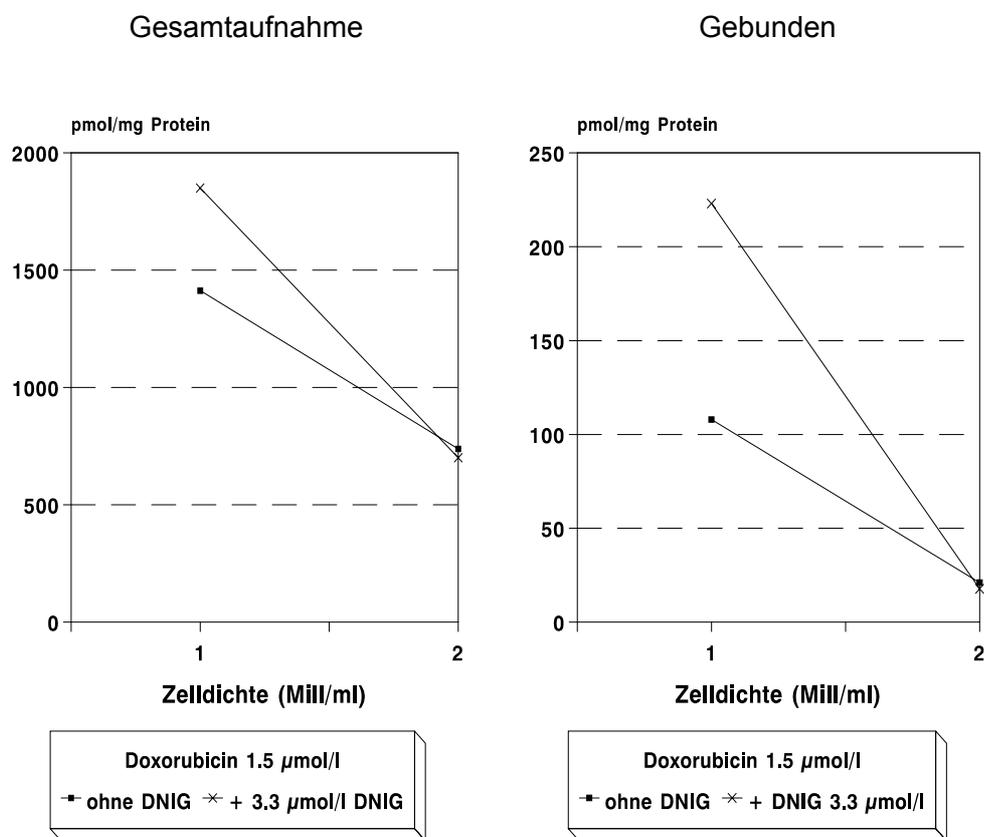
Sensitivitätsindex < -80 = wirksam, zw. -40 und -80 = fraglich, > -40 = unwirksam

Abbildung 3.18 A 92/041 Monolayerproliferationsassay**Tabelle 3.30** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur A 92/041 (relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	+60.5	-1.1	-35.5		-3	unwirksam
NOV	-21.9	-35.5	-40.5		-86	wirksam
MTX	+69.9	+59.7	+45.0		+144	unwirksam
DNR	-21.6	-36.3	-66.5		-88	wirksam
VCR	+94.1	+44.2	-25.3		+107	unwirksam
ADR	+32.9	-10.6	-16.6		-25	unwirksam
ADR +						
DNIG K1	+11.7	-22.2	-26.2		-42	fraglich
DNIG K2	+1.7	-36.2	-39.7		-69	fraglich
DNIG K3	-15.2	-57.7	-64.1		-111	wirksam
DNIG K4	-37.9	-72.9	-109.0		-140	wirksam
DNIG	+90.4	+92.1	+67.1	+16.3	+129	unwirksam

Abbildung 3.19

A 92/041 Antracyclintransport

**Tabelle 3.31** A 92/041 Einzelwerte (pmol/mg Protein)

Zelldichte	Gesamtaufnahme		Gebunden	
	Kontrolle	+ DNIG	Kontrolle	+ DNIG
1 Mill./ml	2074,9	1110,9	131,5	287,3
	1412,7	1849,4	107,9	223,0
	984,6	2132,4	83,6	49,8
2 Mill./ml	1546,3	564,3	12,9	21,2
	620,2	720,4	41,0	17,7
	738,4	700,9	21,0	12,1

3.3 Referenzlinien

Da bei den Referenzlinien 2 unterschiedliche Chargen Dexniguldipin genutzt werden mußten, wurden diese jeweils doppelt im Monolayerproliferationsassay getestet. Die immunhistologischen Untersuchungen und die Transportversuche erfolgten einfach. Tabelle 3.32 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Tabelle 3.32 Ergebnisse der Referenzlinien

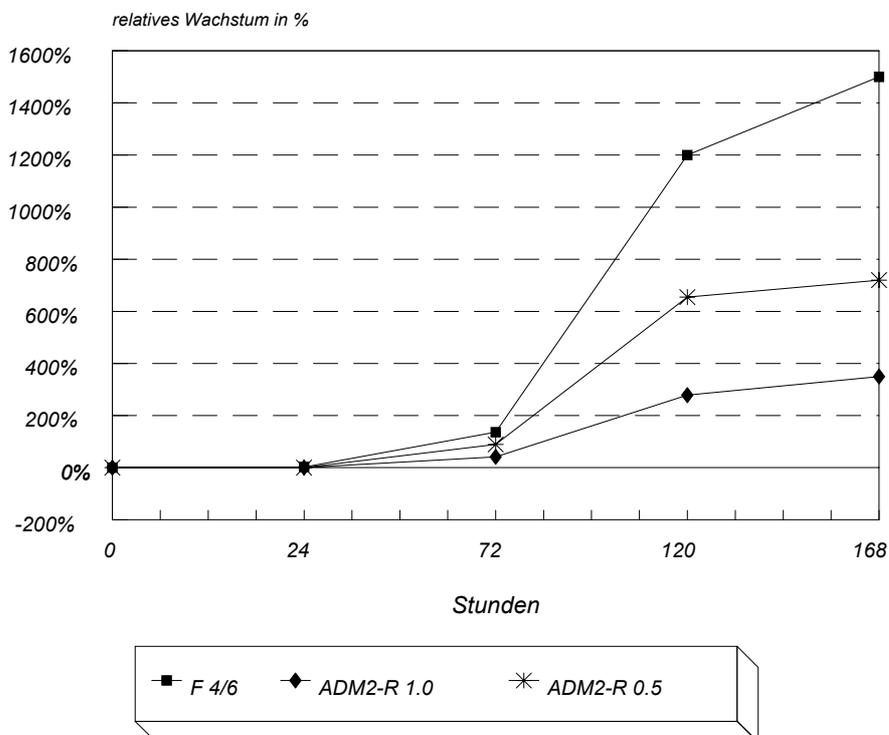
	F 4/6	ADM2 ^R / 0,5	ADM2 ^R / 1,0
MPA: 1./ 2. Vers.			
Wirksamkeit ADR	sensibel / sensibel	resistent / resistent	resistent / resistent
ADR + DNIG	sensibel / sensibel	resistent / sensibel	resistent / sensibel
DNIG	resistent / resistent	resistent / sensibel	resistent / sensibel
Transport:			
MDR-typisch	gering	deutlich	deutlich
Histologie:			
JSB-1	negativ	positiv	positiv
MRK-16	negativ	negativ	negativ
C-219	negativ	negativ	negativ
Einteilung MDR	---	MDR	MDR

In den parallel durchgeführten Wachstumskontrollen ergab sich das in Tabelle 3.33 und Abbildung 3.20 dargestellte Bild. Bis 24 h nach dem Aussäen verhielten sich die Zelllinien ungefähr identisch, danach wuchsen die resistenteren Linien langsamer als die Stammlinie F 4/6. Insgesamt war das Wachstumsverhalten der Zelllinien zum 2. Versuch hin ebenfalls deutlich langsamer als zu Beginn der Kultivierung.

Tabelle 3.33 Wachstumskontrollen der Referenzlinien, absolute Zellzahlen

Zelllinie Passage	t = 0	24 h	72 h	120 h	168 h
F 4/6	10000	12447	136041	1.2×10^6	1.5×10^6
ADM ² R (0.5)	10000	9088	89270	655000	720000
ADM ² R (1.0)	10000	10520	41458	278333	350000

Abbildung 3.20 Referenzlinien, Wachstumskontrollen: relatives Wachstum in %



3.3.1 F 4/6

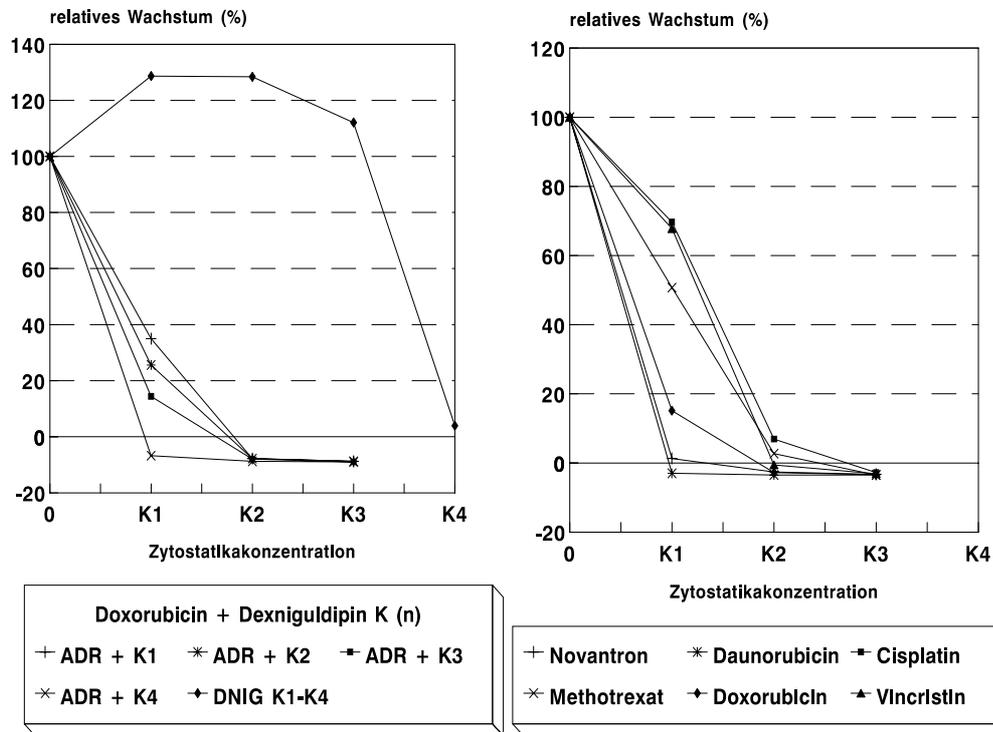
MPA: wirksam waren im 1. Versuch: ADR, DNR und die Kombination ADR + DNIG. Alle anderen Medikamente waren unwirksam bzw. fraglich wirksam. Das Proliferationsverhalten ist bei allen eingesetzten Medikamenten dosisabhängig. Im 2. Versuch verschiebt sich die Wirksamkeit der Medikamente: Hierbei waren CDDP, NOV und VCR ebenfalls wirksam. Im Antracyclintransport traten relativ geringe Unterschiede bei 3 und 2 Millionen Zellen/ml auf, ein größerer Unterschied war bei 1 Millionen Zellen/ml sichtbar. In der Immunhistologie war PGP mit allen drei Antikörpern negativ.

3.3.2 ADM2^R / 0.5

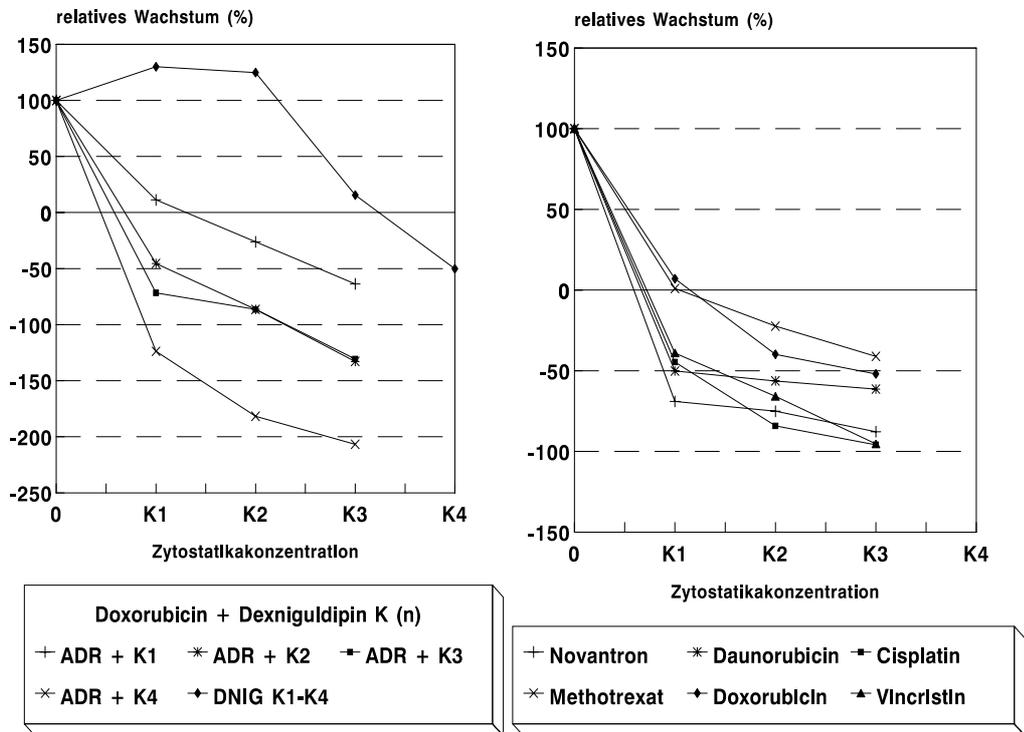
MPA: im 1. Versuch waren bis auf MTX alle Medikamente unwirksam. ADR, VCR und DNR waren hierbei noch schlechter wirksam als die anderen 3 Medikamente. In der Kombination ADR + DNIG gibt es einen deutlichen Wirkunterschied zwischen den zugesetzten Konzentrationen DNIG K1 / K2 und K3 / K4, hierbei kam es zu einer Verbesserung des Ergebnisses um fast 80 %. Im 2. Versuch waren MTX, VCR, DNIG und die Kombination ADR + DNIG wirksam, alle anderen wiederum unwirksam. Im Vergleich sind die Zellen gegen DNR und ADR am resistentesten (wie bereits im 1. Versuch sichtbar). Gegen VCR ergibt sich keine Resistenz. Im Antracyclintransport sind bei allen Zelldichten deutliche Unterschiede in der Aufnahme bei den Kontrollen und der Applikation von DNIG sichtbar. In der Immunhistologie war PGP mit JSB-1 positiv.

3.3.3 ADM2^R / 1.0

MPA: Im 1. Versuch sind MTX und ADR+DNIG K4 wirksam, alle anderen Medikamente und die Kombinationen unwirksam. Gegen die MDR-Medikamente ADR, VCR und DNR sind die Zellen resistenter als gegen die anderen drei Substanzen, in den Kombinationsmedikationen ist ein deutlicher Unterschied zwischen ADR + DNIG K2 und K3 von ca. 60 % relativem Wachstum zu sehen. Der 2. Versuch ergibt im Unterschied dazu, daß hierbei alle Kombinationsformen sowie auch die DNIG-Monoapplikation wirksam sind. Alle anderen Medikamente sind unwirksam oder fraglich wirksam. DNR, ADR und VCR sind noch geringer wirksam als die anderen Medikamente. Es ergibt sich ein Unterschied in der Kombination zwischen ADR + DNIG K1 und K2 von ca. 250% relativem Wachstum. Im Antracyclintransport ist bei allen Zellkonzentrationen ein deutlicher relativer Unterschied darstellbar. In der Immunhistologie ergab sich PGP positiv mit JSB-1.

Abbildung 3.21 F 4/6 Monolayerproliferationsassay, 1. Versuch**Tabelle 3.34** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur F 4/6 (1. Versuch), (relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

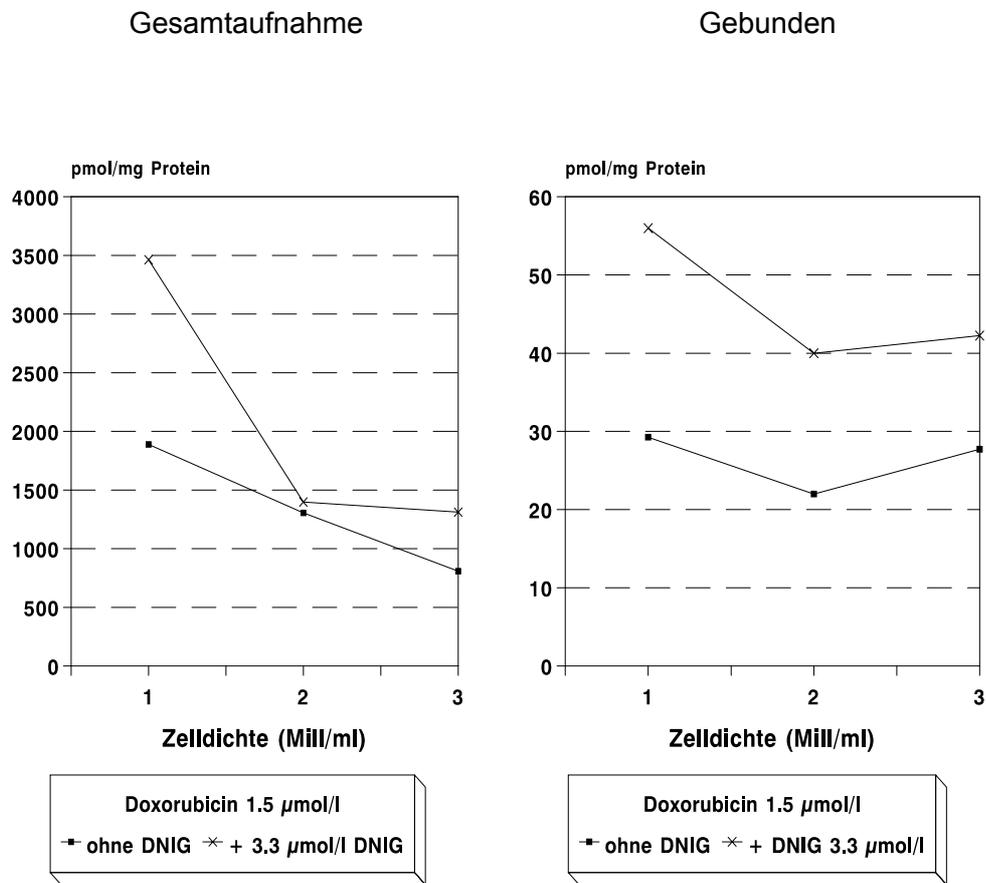
Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	+ 69.7	+ 6.9	- 2.8		+ 204	unwirksam
NOV	+ 1.3	- 2.6	- 3.3		- 76	fraglich
MTX	+ 50.7	+ 2.7	- 3.5		+ 79	unwirksam
DNR	- 3.0	- 3.5	- 3.5		- 103	wirksam
VCR	+ 67.8	- 0.6	- 3.1		- 16	unwirksam
ADR	+ 15.1	- 2.8	- 3.4		- 83	wirksam
ADR +						
DNIG K1	+ 35.0	- 7.8	- 8.8		- 94	wirksam
DNIG K2	+ 25.6	- 7.8	- 8.8		- 94	wirksam
DNIG K3	+ 14.4	- 8.0	- 9.0		- 97	wirksam
DNIG K4	- 6.8	- 8.8	- 9.0		- 106	wirksam
DNIG	+ 128.7	+ 128.4	+ 112.1	+ 3.9	+ 1359	unwirksam

Abbildung 3.22 F4/6 Monolayerproliferationsassay, 2. Versuch**Tabelle 3.35** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur F 4/6 (2. Versuch), (relatives Wachstum bei K(n) in %, Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	-44.6	-84.2	-95.9		-170	wirksam
NOV	-69.0	-75.1	-87.8		-151	wirksam
MTX	+1.0	-22.3	-41.1		-45	fraglich
DNR	-50.2	-56.3	-61.4		-114	wirksam
VCR	-39.0	-65.9	-95.4		-133	wirksam
ADR	+7.1	-39.8	-52.0		-80	wirksam
ADR + DNIG K1	+11.3	-26.1	-63.6		-38	unwirksam
DNIG K2	-45.4	-86.4	-132.9		-126	wirksam
DNIG K3	-71.6	-86.4	-130.7		-126	wirksam
DNIG K4	-123.8	-181.8	-206.8		-265	wirksam
DNIG	+130.0	+124.8	+15.6	-50.2	+31	unwirksam

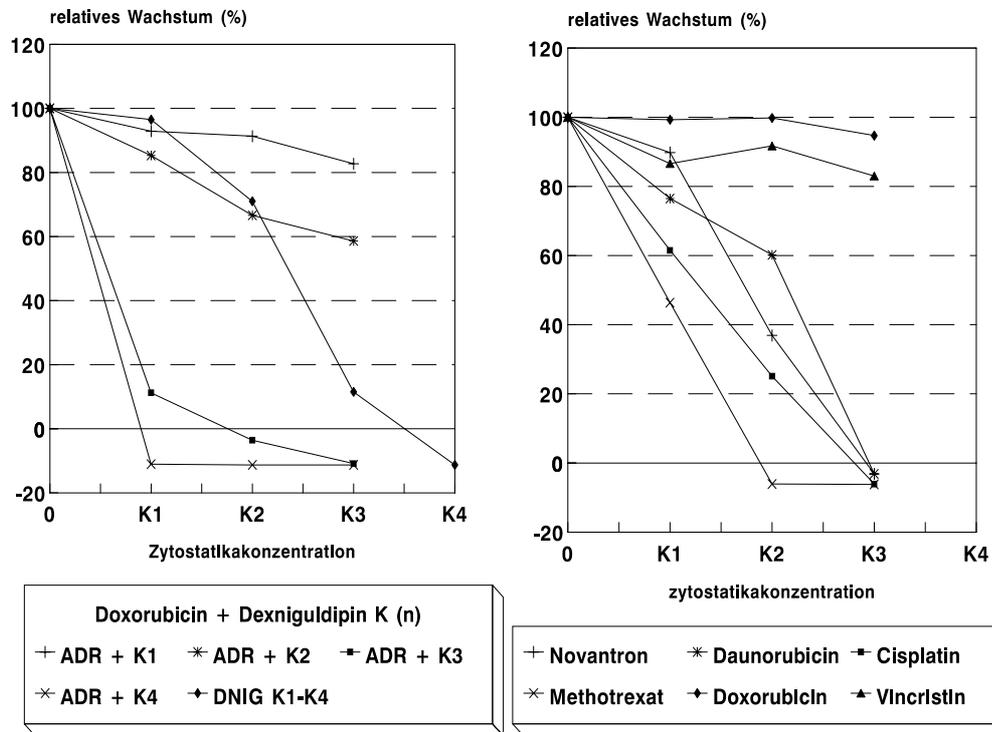
Abbildung 3.26

F 4/6 Antracyclintransport

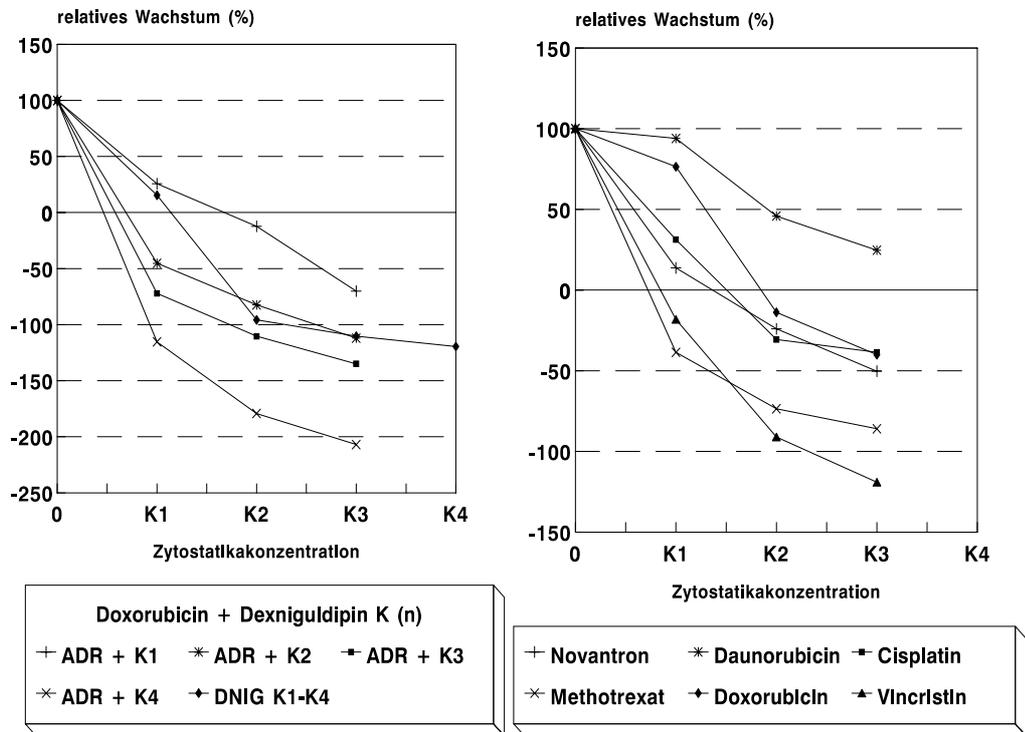
**Tabelle 3.36**

F 4/6 Einzelwerte (pmol/mg Protein)

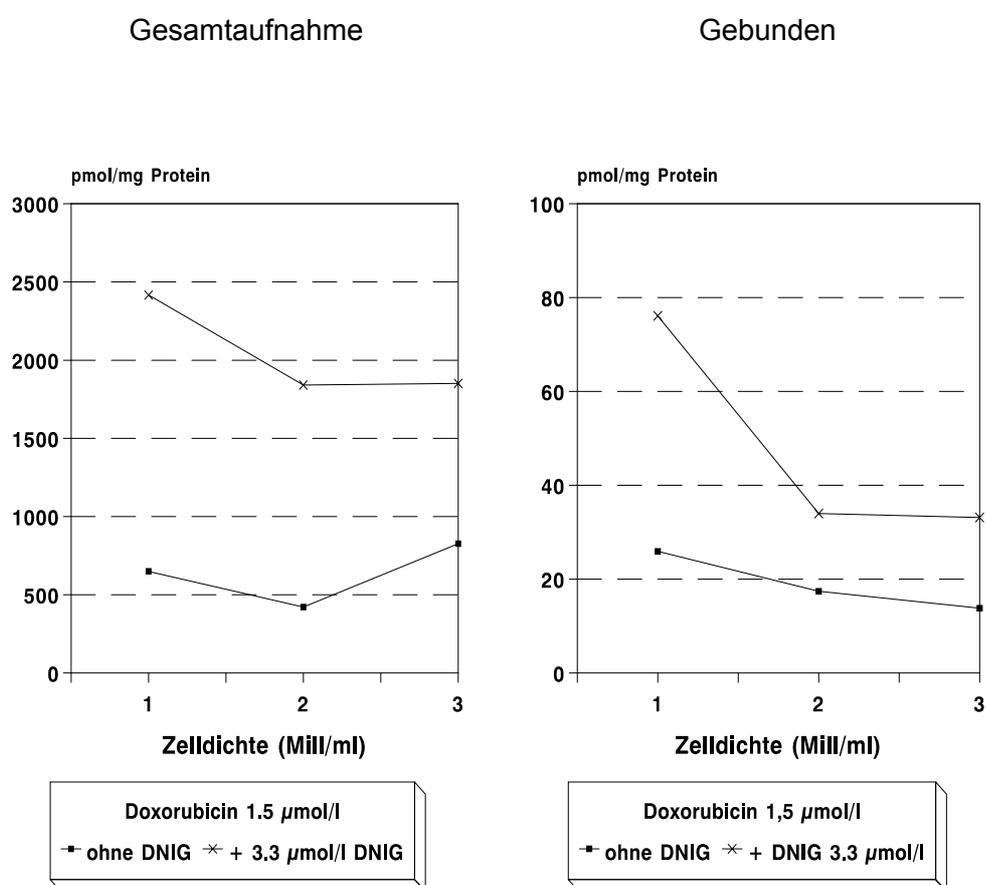
Zelldichte	Gesamtaufnahme		Gebunden	
	Kontrolle	+ DNIG	Kontrolle	+ DNIG
1 Mill./ml	1656,6	2234,0	15,8	66,2
	2780,0	3472,5	48,9	55,9
	1889,0	3463,0	29,3	52,2
2 Mill./ml	1305,8	1398,1	18,5	27,5
	1395,2	1402,6	26,6	54,5
	1355,2	1400,4	22,0	40,2
3 Mill./ml	894,1	1253,5	34,4	41,4
	726,9	1342,3	23,6	63,6
	808,2	1311,1	27,7	42,2

Abbildung 3.27 ADM2^R 0,5: Monolayerproliferationsassay, 1. Versuch**Tabelle 3.37** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur ADM2^R 0,5 (1. Versuch), (relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

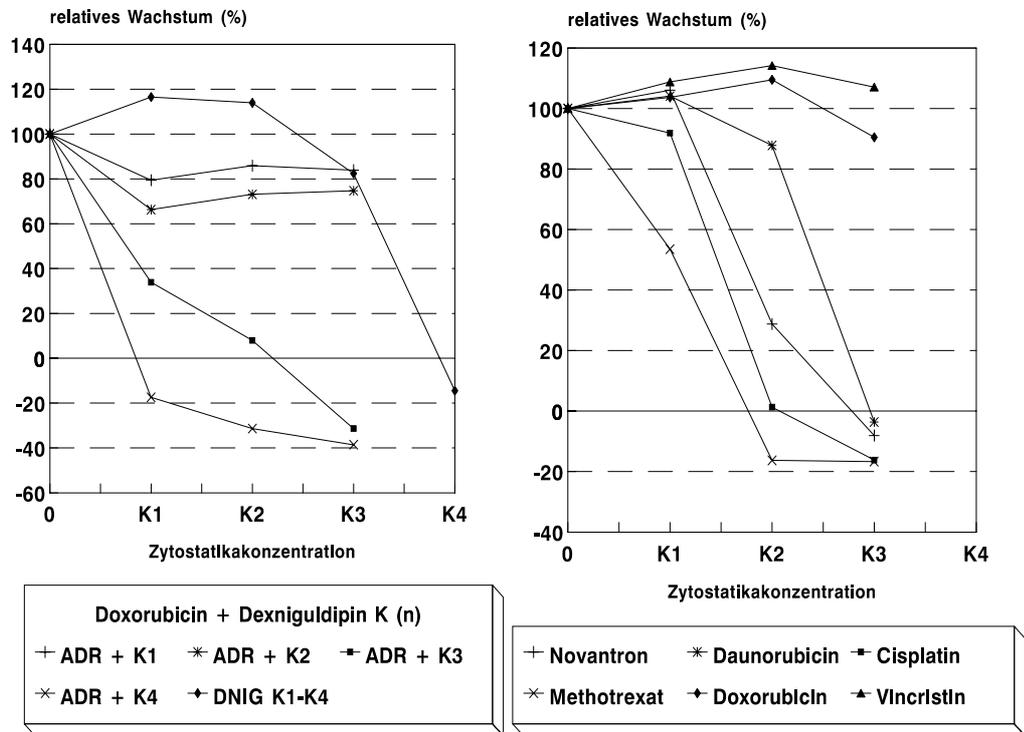
Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	+ 61.5	+ 25.1	- 6.1		+ 423	unwirksam
NOV	+ 89.8	+ 36.9	- 3.2		+ 622	unwirksam
MTX	+ 46.4	- 6.1	- 6.2		- 103	wirksam
DNR	+ 76.5	+ 60.2	- 3.2		+ 1015	unwirksam
VCR	+ 86.8	+ 91.7	+ 83.0		+ 1546	unwirksam
ADR	+ 99.3	+ 99.8	+ 94.7		+ 1682	unwirksam
ADR +						
DNIG K1	+92.9	+ 91.3	+ 82.7		+ 897	unwirksam
DNIG K2	+ 85.3	+ 66.6	+ 58.6		+ 654	unwirksam
DNIG K3	+ 11.2	- 3.6	- 10.9		- 35	unwirksam
DNIG K4	- 11.1	- 11.3	- 11.3		- 111	wirksam
DNIG	+ 96.5	+ 71.0	+ 11.5	- 11.3	+ 113	unwirksam

Abbildung 3.28 ADM2^R 0,5: Monolayerproliferationsassay, 2. Versuch**Tabelle 3.38** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur ADM2^R 0,5 (2. Versuch),
(relatives Wachstum bei K(n) in %, Sensitivitätsindex und Bewertung)

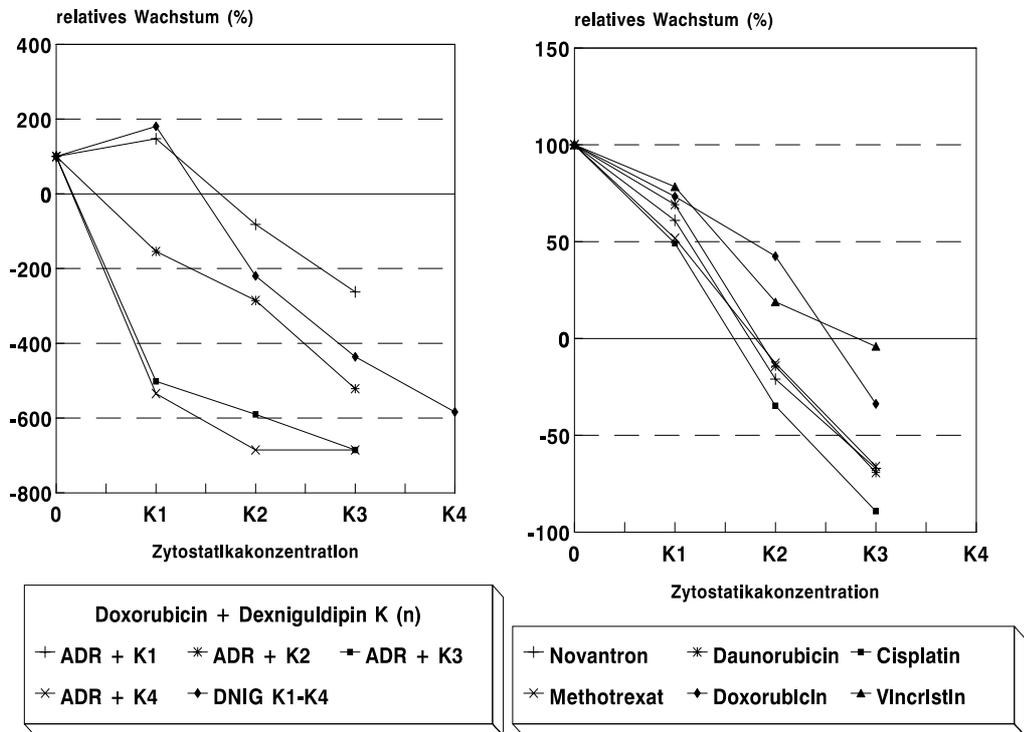
Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	+31.3	-30.6	-38.6		-50	fraglich
NOV	+13.8	-24.0	-50.3		-40	fraglich
MTX	-38.6	-73.6	-86.0		-119	wirksam
DNR	+94.0	+45.9	+24.7		+74	unwirksam
VCR	-18.2	-91.1	-119.1		-148	wirksam
ADR	+76.5	-13.8	-40.1		-22	unwirksam
ADR +						
DNIG K1	+25.7	-12.3	-70.1		-18	unwirksam
DNIG K2	-45.3	-82.4	-112.0		-118	wirksam
DNIG K3	-72.1	-110.3	-135.0		-158	wirksam
DNIG K4	-115.4	-179.3	-207.0		-258	wirksam
DNIG	+15.4	-95.8	-110.3	-119.5	-159	wirksam

Abbildung 3.29ADM2^R 0,5 Antracyclintransport**Tabelle 3.39**ADM2^R 0,5 Einzelwerte (pmol/mg Protein)

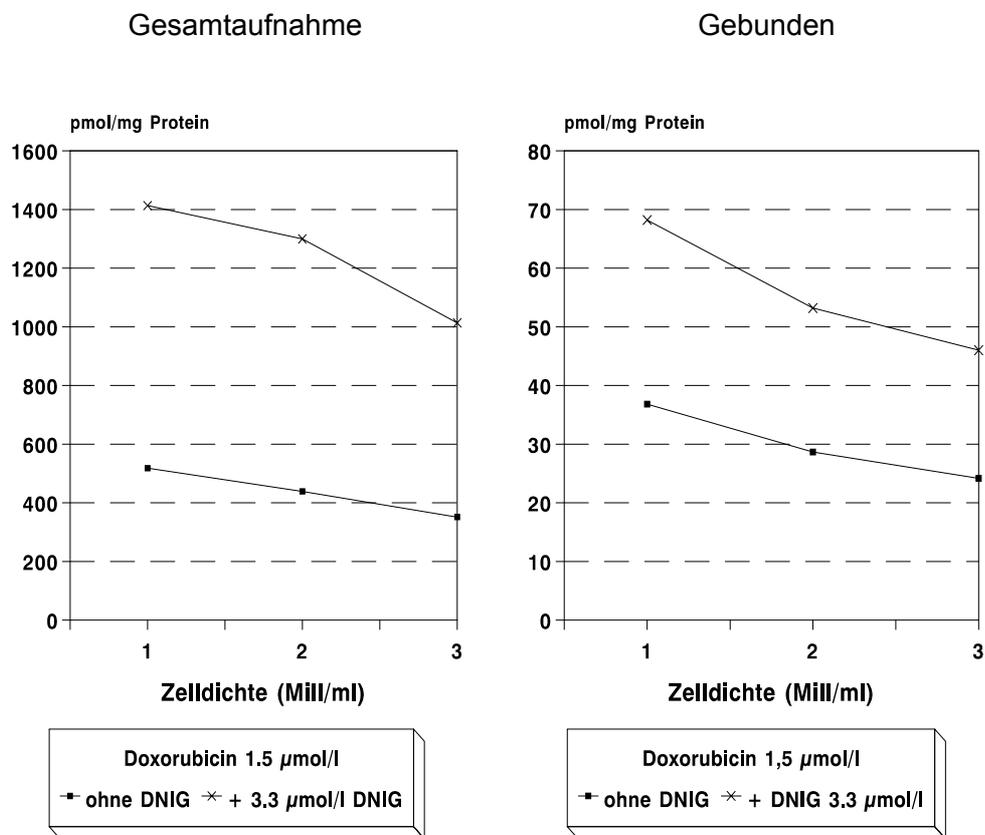
Zelldichte	Gesamtaufnahme		Gebunden	
	Kontrolle	+ DNIG	Kontrolle	+ DNIG
1 Mill./ml	649,7	2294,0	40,5	76,1
	740,5	2416,1	25,9	77,6
	528,9	3069,8	24,3	43,7
2 Mill./ml	361,9	1990,5	17,4	33,6
	422,0	1841,7	14,8	35,6
	550,4	1906,3	23,9	34,0
3 Mill./ml	493,5	2802,4	12,4	29,8
	826,8	1851,7	18,9	33,1
	831,1	1643,0	13,8	37,9

Abbildung 3.30 ADM2^R 1,0: Monolayerproliferationsassay, 1. Versuch**Tabelle 3.40** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur ADM2^R 1,0 (1. Versuch),
(relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	+91.9	+1.3	-16.2		+9	unwirksam
NOV	+106.1	+28.8	-8.1		+201	unwirksam
MTX	+53.5	-16.3	-16.7		-114	wirksam
DNR	+104.1	+87.8	-3.6		+613	unwirksam
VCR	+108.8	+114.2	+107.1		+798	unwirksam
ADR	+103.7	+109.5	+90.5		+765	unwirksam
ADR +						
DNIG K1	+79.4	+85.9	+83.9		+308	unwirksam
DNIG K2	+66.3	+73.1	+74.7		+262	unwirksam
DNIG K3	+33.9	+8.0	-31.4		+29	unwirksam
DNIG K4	-17.4	-31.4	-38.6		-113	wirksam
DNIG	+116.5	+113.9	+82.4	-14.5	+296	unwirksam

Abbildung 3.31 ADM2^R 1,0: Monolayerproliferationsassay, 2. Versuch**Tabelle 3.41** Einfluß der Zytostatika auf die Zellkultur ADM2^R 1,0 (2. Versuch),
(relatives Wachstum bei K(n) in %), Sensitivitätsindex und Bewertung

Zyto- statikum	K1%	K2%	K3%	K4%	Sensitivi- tätsindex	Bewertung
CDDP	+49.2	-34.8	-89.2		-67	fraglich
NOV	+61.0	-21.0	-67.1		-41	fraglich
MTX	+51.8	-12.8	-66.1		-25	unwirksam
DNR	+69.2	-14.3	-69.2		-27	unwirksam
VCR	+78.4	+18.9	-4.1		+37	unwirksam
ADR	+73.3	+42.5	-33.8		+82	unwirksam
ADR +						
DNIG K1	+147.6	-81.9	-262.4		-93	wirksam
DNIG K2	-154.1	-285.3	-521.4		-352	wirksam
DNIG K3	-501.8	-590.3	-685.4		-673	wirksam
DNIG K4	-534.6	-685.4	-685.4		-781	wirksam
DNIG	+180.4	-219.7	-436.2	-583.8	-497	wirksam

Abbildung 3.32 ADM2^R 1,0 Antracyclintransport**Tabelle 3.42** ADM2^R 1,0 Einzelwerte (pmol/mg Protein)

Zelldichte	Gesamtaufnahme		Gebunden	
	Kontrolle	+ DNIG	Kontrolle	+ DNIG
1 Mill./ml	294,1	1561,1	15,9	87,6
	580,6	1413,2	36,8	68,2
	518,2	1221,4	47,9	58,2
2 Mill./ml	437,0	1065,7	26,1	74,5
	438,9	1299,6	28,8	42,5
	553,9	1381,2	40,7	53,2
3 Mill./ml	275,3	889,9	16,8	40,9
	352,3	1013,3	30,4	46,0
	351,6	1058,9	24,2	49,1

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Frage, inwieweit bei 11 Zellkulturen von unterschiedlichen embryonalen Tumoren eine Multi-Drug-Resistance vorliegt und in welcher Weise diese Resistenz von der Substanz Dexniguldipin beeinflusst werden kann. Zur Messung des Zytostatikatransportes werden die Proben mittels eines Monolayerproliferationsassays, einer Silikonöfiltrationsmethode sowie mit drei unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern in einer immunhistologischen Färbung untersucht. Es werden retrospektiv die Krankheitsverläufe der Patienten ausgewertet.

Am Beginn der Diskussion soll eine kritische Bewertung der Methodik und ihrer Probleme stehen. Das größte Problem bei der Wertung von *in vitro* Zytostatikaassays besteht darin, daß mit den Testsystemen nur die direkten antitumoralen Effekte beobachtet werden können. Durch Medikamente induzierte indirekte Effekte wie z.B. die Aktivierung von natürlichen Killerzellen und Lymphozyten können nicht beurteilt werden. Weitere Probleme sind:

- 1) Tumoren zeigen eine zelluläre Heterogenität (Arps et al. 1987, Dietel et al. 1988). Primärkulturen werden aber nur aus einem Teil der Zellen angezüchtet. Ob das Gewebe das Verhalten des Gesamttumors darstellt, bleibt fraglich.
- 2) Die *in vivo* Situation von Tumorzellen bezüglich Sauerstoffversorgung, Nährstoffangebot und Pharmakokinetik ist nur begrenzt *in vitro* nachzuahmen.
- 3) Kombinationstherapien von Zytostatika sind *in vitro* nur begrenzt beurteilbar, da die Einzelsubstanzen z.B. *in vivo* eine deutlich unterschiedliche Pharmakokinetik aufweisen können.
- 4) Mit steigender Passagierung der Kulturen vermindert sich die Anwachsrate, sodaß bei höheren Passagen das Rekultivieren der Tumorzellkulturen in ausreichender Menge für die Silikonöfiltrationsmethode oft nicht gelang.
- 5) Die Untersuchung von Primärzellkulturen mit den drei vorgestellten Methoden beinhaltet einen nicht unerheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand, der bei prätherapeutischen Bewertungen aber möglichst gering sein sollte.

Andererseits bietet die Zellkultur die Möglichkeit Zellpopulationen in einem funktionellen System zu beobachten. Der Nachweis der Schädigung der Tumorzellen gelingt leicht, ebenso kann die Substanzapplikation gut gesteuert werden. Die Silikonölfiltrationsmethode bietet gegenüber anderen Transportmeßmethoden den Vorteil, daß unphysiologische Trennschritte größtenteils vermieden werden und daß die Untersuchungen in einem ausreichend kurzen Zeitraum möglich sind (Edens 1994, Reymann et al. 1993). Nur die möglichst exakte Klassifizierung von Tumorzellen im Hinblick auf die Multi-Drug-Resistance kann die Behandlung mit entsprechenden Resistenzmodulatoren rechtfertigen (Beck 1991). Für die klinische Nutzung muß daher ein Kompromiß aus Zeitaufwand und Sensitivität geschlossen werden.

In den Jahren 1988-1992 sind im Pathologischen Institut des Universitätskrankenhauses Eppendorf insgesamt 27 Fälle im Zellkulturlabor mit den Diagnosen Wilmstumor und Neuroblastom eingegangen. Von 4 Patienten befand sich keine Probe mehr im Labor (15%). 5 Kulturen konnten wegen primärer Kontamination nicht rekultiviert werden (18%), 7 Kulturen (26%) mußten im Laufe der Untersuchungen wegen mangelnden Wachstums verworfen werden, sodaß schließlich 11 Primärkulturen getestet werden konnten (41%). Bezogen auf die 23 vorhandenen Proben wurde wegen Kontamination in 22% und wegen mangelhaftem Wachstum in 30% der Fälle keine Untersuchung durchgeführt. In einer anderen Untersuchung liegen diese Quoten höher, beziehen sich aber auf deutlich mehr eingesandte Proben (Arps 1988: Abbruch wegen Kontamination= 31%, mangelh. Wachstum = 51%, bei 387 Gewebeproben).

Von den 11 untersuchten Fällen wurden 7 als MDR eingestuft, 3 zeigten das Bild einer atypischen MDR. In 5 Fällen fehlte jeweils eine der angestrebten Untersuchungen, diese wurden mit Vorbehalt einer Einstufung unterzogen. In der Literatur beziehen sich die meisten Untersucher bei der Beurteilung einer MDR auf die klinische Resistenzlage und immunhistologisches Markieren des P-Glycoprotein (Chan et al. 1990 und 1991, Goasguen et al. 1993, Haak u. Mitarb. 1993, Miller et al. 1991, Nishiyama et al. 1993, Pavelic et al. 1993, Pileri et al. 1991, Ro et al. 1990, Segawa et al. 1993, Tiirikainen et al. 1993, Toth et al. 1994). Teilweise wird anstelle einer immunhistologischen Antikörperfärbung auch die mdr-1 Genexpression mittels Northern blot untersucht (Goldstein u. Mitarbeiter 1989, Marie et al. 1991, Salmon et al. 1991, Wössner et al. 1994).

Einige Untersucher nutzen Zytostatikassays in Verbindung mit Immunhistologie, so z.B. Cumber (1991), Hart et al. (1993), Ross et al. (1993), Wall et al. (1993) und Stein et al. (1997) mit einem Antracyclin-Flowcytometrie Assay. Sanfilippo et al. (1991) nutzten einen Kurzzeit-Assay (3 h Inkubation von Gewebe, anschließend radioaktive Markierung mit ³H-Thymidin und Messung des Einbaus). Brophy et al. (1994) verglichen vier verschiedene Methoden zur Untersuchung an MDR-Zellen. Mittels PCR, immunhistologischer Färbung, in situ Hybridisierung und Slot Blotting untersuchte die Gruppe 36 Tumorlinien, wobei die in situ Hybridisierung und PCR mit 80% die höchste Konkordanz zeigten .

Eine komplette Übereinstimmung in den Einzeluntersuchungen erzielte diese Studie bei 14/36 Fällen (39%), einfache Abweichung ebenfalls bei 39%. Diese 78% wurden als richtig übereinstimmend gewertet, dabei zeigte die Immunhistologie jeweils 11% falsch positive und 11 % falsch negative Ergebnisse. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, daß 2 Methoden kombiniert werden sollten, am besten in situ Hybridisierung und eine andere Methode wahlweise. Reymann et al. (1996) forderten neben Immuncytochemie und PCR, wann immer vom Zeitaufwand zu vertreten, einen zusätzlichen funktionellen Test. In der vorliegenden Arbeit werden neben dem Zytostatikassay und der klinischen Beurteilung zwei zusätzliche MDR-spezifische Methoden eingesetzt. In dem Fall eines fehlenden Ergebnisses konnte daher auf der Basis der beiden anderen Befunde trotzdem eine Einstufung hinsichtlich MDR vorgenommen werden. In einem Fall (D 88/154) konnte weder der Transportassay noch die histologische Färbung durchgeführt werden, so daß auf eine Einstufung verzichtet werden mußte.

Die auch von anderen Autoren beschriebenen Referenzlinien (Edens 1994, Reymann et al. 1993, Schaefer et al. 1993) zeigten in den einzelnen Untersuchungen die im Bezug auf MDR erwarteten Ergebnisse. Allerdings zeigte selbst die sensitive Stammlinie F4/6 einen Modulationseffekt im Transportassay, der hinweisend auf eine gering ausgeprägte MDR wäre. In den Voruntersuchungen zeigte sich dies nicht.

Schaefer et al. (1993) beschrieben eine geringe mdr-1 Genexpression in dieser Linie, sowie eine 200-fach geringere ADR-Resistenz verglichen mit den resistenten Linien (ADM2^R). Reymann et al. (1993) beschreiben bei F4/6 Zellen ebenfalls einen geringen Effekt im Transportassay. Nachstehend sind die Ergebnisse der Untersuchungen in Tabelle 4.1 noch einmal zusammengefasst (zur näheren Erklärung siehe auch Tabelle 3.1, Seite 28).

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Linie	Proliferationsassay				Transport-	Immun-	Verlauf	TYP
	Chemo vor PE	ADR	ADR + DNIG	DNIG	assay TRA: MDR	histochemie PGP: JSB-1		
D 88/154 – WT	N	P	S	P	n.u.	n.u.	CR	-
D 88/210 – WT	N	R	S	S	J	n.u.	CR	MDR
D 89/177 –NBL	N	R	S	R	N	n.u.	CR	atyp
A 90/192 – WT	J	P	P	R	n.u.	J	CR	MDR
A 91/014 – NBL	N	S	S	S	n.u.	J	PD	MDR
A 91/041 – WT	J	R	R	R	J	J	PD	MDR
A 91/049 – NBL	N	R	S	R	N	N	CR	atyp
A 91/060	N	P	S	S	N	n.u.	CR	atyp
A 92/005 – NBL	J	P	S	S	J	J	CR	MDR
A 92/037 – NBL	J	S	S	R	J	J	PR	MDR
A 92/041 – NBL	J	R	S	R	J	J	MR	MDR
F 4/6	-	S / S*	S / S*	R / R*	J	N	-	-
ADM2 ^R / 0,5	-	R / R*	R / S*	R / S*	J	J	-	MDR
ADM2 ^R / 1,0	-	R / R*	R / S*	R / S*	J	J	-	MDR

* n = 2, Abk.: TRA=Transportassay, PGP=Immunhistologie mit JSB-1, J=ja, N=nein, R=resistent, S=sensibel, P= fraglich, n.u.=nicht untersucht, MDR= Multi Drug Resistance, atyp= atypische MDR, ADR=Doxorubicin, DNIG=Dexniguldipin

Von 4 Wilmstumoren waren 3 als MDR eingestuft. 3 verliefen CR, einer PD. Der Fall mit PD war ein Stadium IV- Tumor, die anderen waren im Stadium I und II. In einer 1990 veröffentlichten, bundesweit erhobenen Studie (Gutjahr et al. 1990) wird bei 373 Kindern mit Wilmstumor während eines 8-jährigen Beobachtungszeitraumes in den Stadien I und II ein rezidivfreies Überleben bei 97% und 93% geschildert. 9,5% der Patienten erlitten ein Rezidiv oder starben. Kinder mit niedrig malignen Varianten (mesoblastisches Nephrom) hatten eine Überlebensrate von 87%.

Diese Daten sind mit den hier erhaltenen *in vitro* Befunden kompatibel, wobei eine wesentlich größere Heterogenität des Patientengutes zu beachten ist. Goldstein et al. beschreiben 1989 in einer großen Studie bei 20 Wilmstumoren keinen einzigen Fall mit MDR, wogegen Lum et al. 1993 bei Wilmstumoren intrinsische MDR beschreiben. Die Hälfte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gewebeproben aus Wilmstumoren

stammte aus zuvor nicht chemotherapiertem Gewebe, so daß hierbei auch von einer intrinsischen MDR auszugehen ist.

Bei den 6 untersuchten Neuroblastomen verliefen 3 CR (Stadium I, II u. III). 3 als Stadium IV klassifizierte Tumoren verliefen PD, PR u. MR. 4 Fälle wurden als MDR-positiv eingestuft, 2 als atypisch MDR. Chan et al. (1990) publizierten bei MDR-positiven Neuroblastomen eine CR-Rate von 46%, bei non-MDR hingegen von 84%. Lum et al. (1993) beschreiben in einer NBL-Studie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Inzidenz von 10% MDR, bei Rezidiven von bis zu 30%.

In den hier durchgeführten Untersuchungen verliefen 25% der MDR positiven Neuroblastome CR, dagegen 100% der MDR negativen. Zum Zeitpunkt der Diagnose wurden 60% der Neuroblastome als MDR eingestuft, bei Rezidiven 100%.

Bei dieser methodischen Studie liegt die Beurteilung der Befundkonstellationen im Vordergrund, eine prozentuale Auswertung ist hierbei eigentlich nicht zulässig. Dennoch sind auch die auf dieser geringen Zahlenbasis erhobenen Daten mit den in der Literatur angegebenen Ergebnissen gut vergleichbar.

Goldstein et al. (1989) unterscheiden zwischen vorbehandelten Tumoren (42% MDR) und nicht vorbehandelten (9% MDR). Desgleichen bei einer Studie von Mattern u. Volm (1989): Vorbehandelte Tumoren 100% MDR, nicht vorbehandelte 50% MDR. Michieli et al. (2000) untersuchten die PGP-Expression in 23 Fällen mit akuter Leukämie. Hier war bei Diagnosestellung kein Fall PGP positiv, beim 1. Rezidiv einer von 23 und beim 2. Rezidiv 75% der Fälle. In der vorliegenden Arbeit resultierte bei vorbehandelten Tumoren 100% MDR, bei nicht vorbehandelten 33%.

Bei den als atypisch resistent eingeordneten Fällen handelt es sich um 2 Neuroblastome und ein Teratom. Meyers et al. (1989) beschreiben atypische MDR bei Neuroblastomen, die auf Chemosensitizer reagieren. An anderer Stelle wird dagegen ein fehlender (Reymann et al. 1996) oder auch nur ein geringer Modulationseffekt bei atypischer MDR beschrieben (Barrand et al. 1993).

Im Monolayerproliferationsassay ergab sich eine Vorhersagegenauigkeit von 83% für ein richtig vorhergesagtes Testergebnis, wobei ein falsch positives Ergebnis vorlag (S/R). Arps (1988) erhob eine Genauigkeit von 73% für den gesamten Assay (bezogen auf 105 Testergebnisse). 1987 publizierte der gleiche Autor 88% Genauigkeit und 12% falsch positive Ergebnisse.

Bemerkenswert ist, daß in allen drei genannten Untersuchungen kein falsch negatives Ergebnis resultiert, was bedeutet, das hypothetisch keinem Patienten aufgrund eines resistenten Testergebnisses ein evtl. wirksames Medikament vorenthalten würde. Dem stehen die in dieser Arbeit erhobenen Befunde auch nicht entgegen.

In den Untersuchungen ist die Genauigkeit der Vorhersage eines unwirksamen Testergebnisses unterschiedlich hoch (100%, 87% und 34%), obwohl der Test hierfür eigentlich prädestiniert ist (Arps 1988). Vergleichbare Resultate erzielten Albrecht et al. 1985, in deren Untersuchung zu 78% eine Resistenz vorhergesagt wurde, bei einer Genauigkeit von 93% für den gesamten Test, bezogen auf 42 Fälle. Die Unterschiede kommen am ehesten durch die verschiedenen großen Fallzahlen zustande. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse (S/S= richtig positiv und R/R = richtig negativ, jeweils 100%) beziehen sich auf 6 auswertbare Fälle und sind damit nicht repräsentativ.

Die Resistenzlage gegen MDR-assoziierte Medikamente und gegen solche, die normalerweise nicht mit MDR vergesellschaftet sind, gestaltete sich sehr heterogen. So zeigten in den als MDR-positiv bzw. als atypisch resistent eingestuften Zelllinien bis auf 2, alle anderen verschieden stark ausgeprägte Resistenzen gegen NOV, CDDP und MTX. Zusätzlich prägten drei dieser Zelllinien keine Kreuzresistenz gegen die untersuchten MDR-Medikamente aus. Zum einen könnte dies aus systematischen Fehlern resultieren, dafür bieten die Ergebnisse jedoch keinen Anhalt. Zum anderen könnte dies auch ein tumorspezifisches Bild sein. Neuroblastome entwickeln zumeist erst unter der Therapie mit Zytostatika eine MDR (Beck 1990, Bellamy et al. 1990, CordonCardo et al. 1990, Goldstein et al. 1989, Gottesman und Pastan 1988, Kuroda et al. 1991, Mattern und Volm 1989). Die Expression des PGP liegt in der Literatur bei nicht vorbehandelten zwischen 9% und 50%, bei vorbehandelten zwischen 30% und 100% (Goldstein et al. 1989, Lum et al. 1993, Mattern und Volm 1989). Bei allen Zelllinien, die keine Kreuzresistenz aufweisen, handelt es sich um Neuroblastome, so daß diese Erklärung zutreffen könnte.

Sanfilippo et al. (1991) fanden bei 48 Mammacarcinomen in allen PGP-positiven Zellen auch eine Simultanresistenz gegen VCR und ADR. Marsh und Center (1987) untersuchten ADR-resistente HL-60 Zellen und fanden bei diesen eine Kreuzresistenz gegen DNR bei 75%, VCR bei 25%, Colchicin bei 10%, ACD 15%. Kuroda et al. (1991) beschreiben in zwei MDR-NBL-Linien eine Resistenz gegen CDDP. Dietel et al. (1990)

finden bei einer NOV-resistenten EPG-Linie eine Kreuzresistenz gegen ADR und DNR, nicht aber gegen VCR. Zusätzlich zur MDR-typischen Resistenz auftretende Kreuzresistenzen beschreiben auch Dietel 1991, Jensen et al. 1993, Ma und Bell 1989 sowie Ross et al. 1993. Diese Daten belegen, daß die sich in den eigenen Untersuchungen zeigende Heterogenität der Resistenzlage auch von vielen anderen Autoren beschrieben wird.

Die Substanz Dexniguldipin wurde in 4/11 Fällen als allein zytostatisch wirksam getestet (36%). 2 Neuroblastome, 1 Wilmstumor und das Teratom sprachen auf eine DNIG Monotherapie als sensibel an. Eine zytostatische Wirkung von Dexniguldipin wird von Karck et al. 1992, Schuller et al. 1990 und 1994 und Wolf et al. 1991 in Untersuchungen an Lungencarcinomen beschrieben. Bei einem Ratten-Coloncarcinom fanden Van de Vriew et al. 1996 dagegen keine zytostatische DNIG-Wirkung. Auch in dem in dieser Arbeit untersuchten Patientengut kann keine signifikante Wirkung von Dexniguldipin als Monotherapeutikum gesehen werden.

Schuller et al. (1994) erklärten die zytostatische Wirkung von DNIG mit der Hemmung der Proteinkinase C und des Calmodulins, Gekeler et al. (1996) beschreiben hingegen, daß eine Hemmung der PKC keine Hauptrolle in der PGP assoziierten MDR spielt. U.A. an einer Hela MDR-Zelllinie wurde die PKC mit einer Bisindolylverbindung gehemmt und die Zellen mit DNIG und Verapamil behandelt. Es wurde kein signifikanter Effekt bezogen auf die *mdr-1* Genexpression dargestellt.

Die Resistenzmodulation von DNIG wird durch eine direkte Interaktion mit dem P-Glycoprotein in Zusammenhang gebracht (Hoffmann et al. 1995), die direkte Bindung an PGP erfolgt wohl an einer cytoplasmatischen Domäne des Proteins (Ferry et al. 2000). Wigler (1999) beschreibt eine nicht-kompetitive Hemmung des PGP durch DNIG sowie durch PSC 833 und CSA.

1990 publizierten Schuller et al. eine sehr gute Wirkung von DNIG bei induzierten neuroendocrinen und nasocavalen Tumoren bei Hamstern, nicht jedoch bei Larynx- und Trachealcarcinomen. Eine fehlende Modulation wurde an zwei Leukämiezelllinien beschrieben (Hill u. Hosking 1994, Ludescher et al. 1995).

Als Chemosensitizer beschreiben DNIG Dietel et al. 1994, Hofmann et al. 1991 und 1992, Reymann et al. 1993 und Roller et al. 1993, wobei eine ca. 10-fach höhere Potenz als für Verapamil gefunden wurde (Hofmann et al. 1992, Reymann et al. 1993). Eine antracyclinmodulierende Wirkung von DNIG beschreiben Hoffmann et al. 1991 in Hela-KB-85 Zellen. An einem *in vivo* Tumormodell bei Nacktmäusen beschreiben Dietel et al. 1996 ebenfalls eine modulierende Wirkung.

Hierbei wurden F4/6RADR Zellen injiziert und die Tiere danach mit ADR in Kombination mit DNIG oder Verapamil behandelt. Die Anzahl vitaler Tumorzellen wurde deutlich reduziert (mit DNIG um 67%, mit Verapamil 53%). Roller u. Mitarb. (1993) untersuchten den Einfluß des Dosierungsschemas von DNIG (sequenziell - kontinuierlich) mit einem Flowcytometrie Assay. Hierbei zeigte sich kein entscheidender Unterschied in der zytostatischen Wirkung. In den vorliegenden Untersuchungen ergab sich im Monolayerproliferationsassay bei den ADR-resistenten Fällen in 78% der Fälle ein modulierender Effekt, hier konnte also eine deutliche Wirkung des DNIG als Chemosensitizer dargestellt werden.

3 dieser Fälle waren als klassische MDR eingestuft, 3 als atypisch resistent, ein Fall konnte nicht beurteilt werden. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen beschreiben Barrant et al. 1993, sowie Beck 1990 bei atypischer Resistenz nur ein geringes Ansprechen auf Sensitizer - in den eigenen Untersuchungen war DNIG bei allen 3 als atypisch resistent eingestuften Fällen wirksam. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß Dexniguldipin auch bei atypischer Resistenz wirksam ist. Allerdings sahen auch Meyers et al. (1989) bei Neuroblastomzelllinien einen Effekt von Sensitizern, in diesem Fall wurde ein resistenzassoziiertes 180kDA Protein durch einen Calciumantagonisten per Photolabelling markiert.

Die Resistenzlage der Referenzlinien F 4/6 und ADM2^R wird von verschiedenen Autoren beschrieben. Schaefer et al. (1993) beschreiben eine 200-fache ADR Resistenz von ADMR gegenüber F4/6, mit sehr hoher mdr-1 Genexpression im Northern blot (F4/6 sehr niedrig). Reymann et al. (1993) beschreiben eine Modulation der MDR in F 4/6 Zellen mit Verapamil und Dexniguldipin, Schaefer et al. (1993) mit Dimethyldoxorubicin und anderen Antracyclinanaloga. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen bestätigen diese Aussagen im Bezug auf MDR. Der Wirkunterschied in den doppelt durchgeführten Versuchen (ADM2^R) kann entweder durch Fehler im Versuchsansatz zustandekommen, oder es spielt eine Rolle, daß die Charge des Dexniguldipin gewechselt werden mußte.

Da die Unterschiede nur bei den Versuchen mit DNIG auftraten, ist zweiteres wahrscheinlicher. In diesem Zusammenhang können auch Lagerung und Zubereitung der DNIG-Lösung oder Schwierigkeiten mit dem genutzten Lösungsmittel eine Rolle spielen. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren beobachten wir in Übereinstimmung mit den o.g. Autoren eine Modulation der Antracyclinresistenz in ADM2^R Zellen mittels Dexniguldipin.

1985 entwickelte eine Arbeitsgruppe um Kartner einen monoklonalen Antikörper (C-219) zur PGP-Markierung. Weitere spezifische Antikörper folgten, MRK-16 (Hamada, Tsuruo 1986), JSB-1 (Scheper et al. 1988). MAB C-219 und JSB-1 markieren ein zytoplasmatisches Epitop des PGP, MRK-16 die extrazelluläre Domäne. Seitdem werden diese Antikörper in den immunhistologischen Untersuchungen bei MDR-Zellen genutzt, so z.B. mit gutem Erfolg u.a. von folgenden Autorengruppen: Willingham u. Mitarb. (1987) [MRK-16 an humanen MDR-Zellen], Pileri et al. (1991) [MRK-16 und C-219 an Lymphomen], Nishiyama et al. (1993) [C-219 an Nierenzellcarcinomen], Keizer et al. (1989) [MRK-16 und JSB-1 an Lungencarcinomen].

Im Gegensatz zu diesen Studien waren in der vorliegenden Arbeit die Antikörper C-219 und MRK-16 in allen Fällen negativ. In den untersuchten Zelllinien war als einziger Antikörper JSB-1 positiv (8/10 Fälle).

Alle Zelllinien, die im Transportassay und immunhistologisch untersucht wurden, zeigten in beiden Untersuchungen gleichsinnige Ergebnisse, wenn auch mit unterschiedlicher Ausprägung. Bei einem Vergleich von 5 unterschiedlichen Antikörpern stellten Toth u. Mitarb. (1994) das beste Ergebnis mit JSB-1 fest.

In dieser Studie reagierte MAB MRK-16 ebenfalls nur gering. Diese Untersuchungen erfolgten an formalinfixierten Paraffinblöcken von normalem Körpergewebe, Nierentumoren und humanen MDR-Zelllinien. Axiotis et al. (1991) untersuchten in einem Vergleich 3 verschiedene Antikörper an 36 Endometriumcarcinomen (C-219, C-494, JSB-1). Eine Reaktion mit allen 3 Antikörpern erfolgte nur in 29%, mit zweien in 46% der Fälle. Hingegen zeigten 72% der Carcinome eine Reaktion mit mindestens einem Antikörper. Eine Kreuzreaktion von benutzten Antikörpern mit anderen Proteinen stellten Pavelic et al. (1993) zur Diskussion, die 23 Tumoren und normales Gewebe mit unterschiedlichen Antikörpern untersuchten. Als Fehlerquellen werden unterschiedliche Mechanismen genannt. So ergab eine Untersuchung an Lymphozytenkulturen von CLL-Patienten mit MRK-16 nur 12% PGP-positive Fälle, bei einer *mdr-1* mRNA Expression von 53% (Cumber 1990).

Eine Behandlung mit Neuraminidase verbesserte das Ergebnis zu 52% PGP-positiven Fällen. Hierbei werden anormale Säurereste der Proteine entfernt, die das zu entdeckende Epitop des P-Glycoprotein maskieren ("Masking"). Bei so behandelten Zellen konnte PGP in bis zu 40% mehr als in unbehandelten Fällen registriert werden. Ähnliche Ergebnisse publizierten Axiotis et al. (1991). Ein weiteres Phänomen

schildern Finstad et al. (1991). Bei einigen Chargen C-219 und JSB-1 wurde beobachtet, daß die PGP Expression mit der Blutgruppe A der Patienten korrelierte. Es stellte sich heraus, daß diese Chargen mit Anti-A-Antikörpern verunreinigt waren. Durch Behandlung des zu untersuchenden Gewebes mit A-Erythrozyten verbesserten sich die Ergebnisse. Auch andere Autorengruppen publizieren mit C-219 wenig signifikante Daten (Ross et al. 1993, Weinstein und Coon 1990). In anderen Studien wird dieser MAB allerdings mit gutem Erfolg in histologischen Verfahren eingesetzt (Nishiyama et al. 1993, Ro et al. 1990, Volm et al. 1989). In einer Untersuchung an einer Lungencarcinomlinie wird dargestellt, das mit JSB-1 auch geringe PGP-Level markiert werden (Broxtermann et al. 1989).

Faßt man die dargelegten Daten zusammen, implizieren sie eine vorsichtige Interpretation von immunhistologischen Untersuchungen, sofern nicht mehrere Antikörper genutzt werden. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse in der Immunhistologie rechtfertigen so die daraus gezogenen Schlüsse.

Betrachtet man die Referenzlinien F4/6 und ADM²R, zeigt sich als Reaktion auf die getesteten Antikörper ebenfalls eine alleinige Markierung der resistenten Linien mit JSB-1. Schaefer et al. (1993) publizierten vergleichbare Resultate, hier erfolgte bei den gleichen Zelllinien eine Messung der mdr-1 Genexpression mit Northern blot. Dietel et al. 1994, Reymann et al. 1993, sowie Steinhoff et al. 1989 untersuchten ebenfalls eine MDR Variante der F4/6-Zellen (F4/6RADR) mittels Immunhistologie (C-219), PCR auf PGP170 mRNA und Western Blotting. In den Ergebnissen bot die Linie eine typische Resistenzlage, verglichen mit der sensitiven Linie F4/6. Die Linien F4/6RADR und ADM²R stammen beide von der gleichen Stammlinie ab und bieten im Vergleich verschieden stark ausgeprägte Resistenzen.

Die in den Versuchen genutzte Silikonöfiltrationsmethode entwickelten Reymann et al. 1989. Die Autoren modifizierten eine bereits 1980 von Werdan et al. beschriebene Methode. Hiermit lassen sich auf einfache Weise pharmakologische Parameter unter Bedingungen messen, die der Zellinkubation zu Proliferationszwecken sehr nahe kommen. Das Prinzip besteht darin, den Zellen in ihrem Nährmedium ein radioaktiv markiertes Substrat anzubieten. Durch Zentrifugation läßt sich der Versuch jederzeit sofort beenden, sodaß die bei anderen Methoden nötigen Lösungen oder Resuspensierungsschritte entfallen, und die erhaltenen Substratkonzentrationen genau definiert sind (Reymann et al. 1989, Edens 1994).

Auch wenn man für eine primäre Tumorzellkultur keine Kontrollen hat, kann man durch Untersuchung ohne DNIG, bzw. mit DNIG-Inkubation eine "interne Kontrolle" herstellen, also das Transportsystem funktionell intakt oder blockiert vergleichen. Bei unterschiedlichen Zelldichten differieren die gemessenen Effekte in typischer Weise (siehe Seite 21) (Edens 1994). Dies ergibt sich in Analogie zur Michaelis Menten Kinetik:

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

Bei geringer Zelldichte mit wenig Transportprotein (PGP) findet bei Zugabe von Substrat schnell eine Sättigung statt, V_{\max} ist überschritten. Bei einer hohen Dichte mit wenig PGP kann die Reaktion bei Substratapplikation bis zum Gleichgewicht ablaufen, es resultiert netto keine Sättigung des Enzyms. Blockiert man das Transportprotein (in diesem Falle mit DNIG), resultieren keine wesentlichen Änderungen von V_{\max} , die gemessenen Unterschiede in der Antracylinaufnahme bleiben gering. Bei hoher PGP-Expression und hoher Zelldichte wird das Enzym schnell gesättigt und V_{\max} überschritten, bei Blockade resultiert ein kleiner relativer Unterschied. Wenige Zellen mit viel PGP-Gehalt transportieren einen großen Anteil Substrat, bei Inhibierung ergibt sich ein großer relativer Unterschied in der zellulären ADR-Akkumulation.

Edens 1994, sowie Reymann et al. 1989, 1991 u. 1993 untersuchten mit dieser Methode die Linien F4/6 und F4/6RADR und validierten die Untersuchungen im Bezug auf MDR. Die Modulation wurde mittels DNIG (Reymann 1993) und Verapamil (Edens 1994) dargestellt.

Keizer et al. (1989) untersuchten vier MDR Lungentumorzelllinien mittels Fluoreszenz-spectrometrie und Immunhistologie (MRK-16, JSB-1). Mit steigender Resistenzlage fiel die ADR-Akkumulation ab, der Efflux wurde gesteigert und die zelluläre Verteilung des ADR verschob sich vom Zellkern nach cytoplasmatisch. Dies steht im Kontext zu den vorgenannten Ergebnissen. In den vorliegenden Untersuchungen kann das aufgenommene Substrat in 2 Phasen des Ansatzes wiedergefunden werden. Dies könnte mit einer Kompartimentalisierung erklärt sein. Da die vorliegenden Daten jedoch keine Rückschlüsse über getrennte Kompartimente zulassen, wurde die durch

TCA trennbaren Fraktionen als "zytosolisch" = Substratgehalt in der TCA-Phase und "gebunden" = Substrat in der säurefällbaren Fraktion definiert (Edens 1994).

Da Antracycline eine hohe Affinität zu DNA haben, wurde die gebundene Fraktion als zum Zellkern gehörend angesehen. Bei den untersuchten Primärtumoren sowie den Linien F4/6 und ADM2^R korrelierten die Ergebnisse im Transportassay in den als MDR eingeteilten Fällen mit den immunhistologischen Untersuchungen und dem Proliferationsassay. In den Fällen, welche als atypisch resistent eingestuft wurden, ergab sich keine Übereinstimmung in Transportversuch, Proliferationsassay und Immunhistologie. D.h. bei ADR-resistenten Linien mit Chemosensitisation im Monolayerproliferationsassay ergab sich weder der typische Transporteffekt, noch eine immunhistologische Markierung.

Seitdem 1981 Tsuruo et al. eine Modulation der ADR-Resistenz von P388 Leukämiezellen entdeckten, ist eine Vielzahl von Substanzen in dieser Hinsicht untersucht worden, u.a. auch natürliche Substanzen wie z.B. Rosmarinextrakt (Plouzek et al. 1999). Die meisten Autoren beschäftigen sich mit Calciumantagonisten, speziell Verapamil. Efferth et al. (1993), Gottesman und Pastan (1988), Raderer und Scheithauer (1993), sowie Weinstein et al. (1990) stellen dar, daß Verapamil ein effektiver Chemosensitizer ist, aber durch die erheblichen systemischen Nebenwirkungen einer Dosislimitierung unterliegt. Alle Modulatoren können die Toxizität einer Chemotherapie erhöhen, zum einen über substanz eigene Wirkungen, zum anderen über die (erwünschte) PGP-Hemmung und die daraus folgende Eliminationshemmung der Zytostatika (Lehnert 1994, Rothenberg und Ling 1989, Nuessler et al. 1997). Verapamil verstärkt die Kardiotoxizität von ADR (Akimoto et al. 1993), DNIG induziert cardiovaskuläre und zentralnervöse Nebenwirkungen (Nuessler et al. 1997). Gute *in vitro* Verapamileffekte erreichten Bellamy et al. (1988) und Salmon et al. (1991) bei Myelomzelllinien, Yusa und Tsuruo (1989) und Marie et al. (1993) an K-562-Leukämiezellen, sowie Moins et al. (2000) an rhinopharyngealen Tumorzellen.

Allerdings berichten andere Autoren durchaus auch von fehlender Modulatorwirkung: Barrant et al. 1993 bei Lungencarcinomen, Dietel et al. 1990 bei Magencarcinomzellen und Reymann et al. 1996 ebenfalls an Magencarcinomzellen. Eine Arbeitsgruppe um H. Chan (1991) relativiert von anderen Autoren erhobene Befunde bei Myelompatienten (40% Responder bei Verapamil, anders als Dalton et al. 1989) und Lymphompatienten (72% bei Verapamil Responder, anders als Miller et al. 1991).

In beiden Studien ist methodisch bedingt nicht der Nachweis erbracht, daß diese Effekte ausschließlich durch den Modulator erfolgten. Wichtig scheint auch die Einwirkzeit des Chemosensitizers zu sein (Cass et al. 1989). Andere Untersucher nutzten Cyclosporin A mit gutem Effekt als Sensitizer (Cumber 1991, Marie et al. 1993, Neumann et al. 1992) und auch bei PSC 833, einem CSA-Analogen, wurde ein guter Effekt dargestellt (Chauncey et al. 2000, Wigler 1999, Moins et al. 2000). Aber auch hier gibt es Studien, die von mangelndem Erfolg berichten, so z.B. Dietel et al. (1990) bei Magencarcinomzellen in denen Verapamil und CSA keinen Effekt zeigten. Als Nebenwirkung steht bei Cyclosporin A Niereninsuffizienz zur Diskussion (Raderer und Scheithauer 1993), eine aus der Transplantationsmedizin bekannte Nebenwirkung dieses Medikamentes. Dietel et al. (1994) publizierten den Begriff "Secondary Combined Resistance". Es wurde eine gegen CSA resistente MDR Linie (F4/6RADR-CSA) kultiviert, die allerdings gegen Verapamil und Dexniguldipin dennoch sensibel war. Diese erworbene Resistenz einer MDR Linie gegen einen Modulator könnte die Unwirksamkeit bestimmter Chemosensitizer erklären.

Eine andere Form von Modulator setzten Wilson et al. (1993) in einer klinischen Studie bei 74 Patienten mit Lymphomen ein. In der EPOCH-Studie behandelten sie diese primär resistenten Patienten zusätzlich zu dem initial angewandten Regime (Etoposid, VCR, ADR, Cyclophosphamid) mit Prednison (oral + i.v.-Gabe) und erzielten bei 71% der Patienten ein Ansprechen auf die neuerliche Therapie. Allerdings kam es auch während dieser Studie zu erheblichen toxischen Nebenwirkungen (Neutropenie in 51% der Zyklen, Fieber 17%), die aber nicht zum Abbruch der Therapie zwangen.

In einer Phase 1 Studie von Chauncey et al. (2000) wurden Patienten mit einer neu diagnostizierten AML mit Mitoxantron/Etoposid in Kombination mit PSC 833 behandelt um die Nebenwirkungen dosisbezogen zu erfassen. Hier wurde PSC 833 sehr gut vertragen, allerdings mußte die Zytostatikadosierung reduziert werden um nicht-hämatologische Toxizität zu vermindern.

Sha et al. (2000) untersuchten 11 verschiedene Dihydropyridinverbindungen (Unterschiede in der Substitution am Phenylring) auf ihre zytotoxische und MDR-modulierende Wirkung die, unterschiedlich ausgeprägt, bei allen untersuchten Substanzen vorlag. Reymann et al. (1991 u. 1993), und Edens (1994) untersuchten Dexniguldipin als Modulator in F4/6-Zellen. Hierbei fand sich, wie auch in den vorliegenden Untersuchungen, ein deutlicher Effekt, wobei auch der Hauptmetabolit des DNIG (eine Pyridinverbindung) gleichermaßen wirksam war.

Dies mag für eine klinische Nutzung von großer Bedeutung sein. Im Gegensatz zu den vielfältigen toxischen Nebenwirkungen verschiedener Chemosensitizer fanden sich in den bisherigen klinischen Untersuchungen mit der Substanz Dexniguldipin nur gering ausgeprägte Nebeneffekte (Karck et al. 1992, Wolf et al. 1991, Prof. Erttmann, pers. Mitteilung 1994). Nuessler et al. (1997) untersuchten die maximal tolerierte Dosis (MTD) für DNIG in einer Phase 1 Studie an 26 Patienten mit verschiedenen Tumoren. Die Nebenwirkungen waren bei 5 Patienten durch cardiovaskuläre Effekte dosislimitierend (Hypotonie, Bradycardie, AV-Blockierung). Ansonsten kam es zu zentralnervösen Wirkungen wie z.B. Erbrechen und Parästhesien. Sämtliche Nebenwirkungen waren 24 Stunden nach Absetzen des Medikamentes wieder voll reversibel, bei keinem Patienten mußte die Therapie abgebrochen werden. Die MTD lag für DNIG bei 5 mg/kg KG/4 Std., Vincristin wurde sofort nach einer 4 – Std. Single Shot Dosis Dexniguldipin appliziert.

In Konzentrationen, die in den Studien eingesetzt werden (DNIG 0,7 - 1,0 $\mu\text{mol/l}$), ist DNIG in der vorliegenden Arbeit als effektiver Chemosensitizer einzustufen. Betrachtet man noch höhere Wirkspiegel (hier 3 $\mu\text{mol/l}$), ist zusätzlich noch die Resistenz in einer der beiden Linien zu durchbrechen, die vorher resistent gegen ADR + DNIG eingestuft wurde. Auch 3 von 7 in der DNIG Monotherapie resistenten Linien könnten, inkubiert mit dieser Konzentration, als DNIG-sensibel eingestuft werden. Die vorliegenden Untersuchungen könnten belegen, daß die Substanz Dexniguldipin ein wertvolles Instrument in der Bekämpfung der Multi-Drug-Resistance werden kann.

5. Zusammenfassung

Die individuelle Wirksamkeit zytostatischer Therapie ist langfristig schwer zu prognostizieren und bleibt nicht selten unbefriedigend. Manche Malignome sprechen zunächst gut auf Zytostatika an, zeigen aber im Rezidiv hohe Therapieresistenz. Bei anderen, von vornherein hochresistenten Tumorspezies wird eine zytostatische Therapie nur in Einzelfällen empfohlen. Bei diesen Resistenzphänomenen spielt die sogenannte Multidrug-Resistenz (MDR) eine wichtige Rolle.

MDR, bei der Tumorzellen eine breite Palette von Zytostatika über eine Permease (P-Glycoprotein) exportieren, wird durch die Expression des *mdr1*-Gens vermittelt. Andere assoziierte Proteine sind das Multi Drug Resistance Protein (MRP) und das Lung Resistance Protein (LRP). MDR ist relativ häufig und wird seit über 20 Jahren intensiv untersucht. Der Wissenstransfer in die Klinik gestaltet sich jedoch kompliziert. Die individuelle Diagnose von MDR, eine darauf angepasste Chemotherapie, oder der Versuch, MDR gezielt pharmakologisch durch bekannte MDR-Modulatoren zu blockieren, wurden bisher außerhalb von klinischen Studien noch nicht realisiert.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Frage, inwieweit bei 11 Zellkulturen von unterschiedlichen embryonalen Tumoren eine Multi-Drug-Resistance vorliegt und in welcher Weise eine Modulation dieser MDR mittels Dexniguldipin erreicht werden kann. Untersucht werden die Proben mit drei Verfahren: einem Monolayerproliferationsassay, einer Silikonölfiltrationsmethode sowie einer immunhistologischen Färbung. Retrospektiv werden die Krankheitsverläufe der Patienten ausgewertet. Zum Vergleich wird eine Zelllinie bekannter Resistenz (F4/6 und ADM2^R) mituntersucht.

Im Proliferationsassay ergibt sich eine Genauigkeit von 83% für ein richtig vorhergesagtes Testergebnis. Richtig positiv (S/S) und richtig negativ (R/R) resultierten jeweils 100% Genauigkeit, ein Ergebnis, das durch die niedrige beurteilbare Fallzahl (n=6) relativiert wird. Es fand sich kein falsch negatives Ergebnis. Das bedeutet hypothetisch, daß keinem Patienten eine wirksame Therapie aufgrund eines falschen Testergebnisses vorenthalten würde. Die Resistenzbefunde der Zellkulturen gegen die benutzten Medikamente sind sehr heterogen. Die meisten MDR-Linien boten unterschiedliche Kreuzresistenzen auch gegen andere Substanzklassen, außerdem ergab sich bei drei dieser Linien keine komplette Kreuzresistenz gegen die eingesetzten MDR-Medikamente.

DNIG wurde in 36% als Monotherapeutikum wirksam eingestuft, bei den ADR-resistenten Fällen gelang in 78% der Untersuchungen eine Resistenzmodulation.

Die Zelllinien F4/6 und ADM2^R boten bei bekannter Resistenzlage jeweils typische Befunde für MDR-Zellen. Beide Zelllinien mußten im Monolayerproliferationsassay doppelt untersucht werden. Es ergaben sich Unterschiede zwischen dem 1. und 2. Versuch, die durch unterschiedliche DNIG-Chargen erklärt werden.

Die immunhistologischen Untersuchungen ergaben die Markierung des PGP einzig mit dem MAB JSB-1. Die beiden anderen genutzten Antikörper (MRK-16 und C-219) waren in allen Zellen, auch denen mit bekannter PGP-Expriemierung (ADM2^R), negativ. In einigen Studien wird dargestellt, daß bei Nutzung verschiedener Antikörper in vielen Fällen keine Übereinstimmung in den Ergebnissen herrscht. Mit der Silikonöfiltrationsmethode ergeben sich bei MDR-Linien, die mit einem potenten Modulator behandelt werden, deutliche Unterschiede in der Antracyclinaufnahme mit und ohne Sensitizer. In den untersuchten Fällen ergab sich eine deutliche Übereinstimmung der Ergebnisse im Proliferationsassay, in der Histologie und in den Transportassays.

Eine Einstufung der Zelllinien im Bezug auf MDR wurde vorgenommen, wenn die Ergebnisse dieser Untersuchungen gleichsinnig waren, miteinbezogen wurde der klinische Verlauf der Fälle.

Von den 11 untersuchten Fällen werden 7 als MDR-positiv eingestuft (63%), 3 als atypisch resistent (27%). Eine Resistenzmodulation mit Dexniguldipin wurde in 78% erreicht. Dies gelingt mit Wirkdosen des DNIG, bei denen in klinischen Untersuchungen keine toxischen Nebenwirkungen beschrieben werden.

Die drei vorgestellten Untersuchungsverfahren (Immunhistologie, Monolayerproliferationsassay und Transportassay) ergeben bei MDR-positiven Zelllinien typische Resultate. Eine Klassifizierung von Tumorzellen als MDR-positiv kann daraufhin erfolgen und den betroffenen Patienten eine unwirksame Chemotherapie ersparen.

In der vorliegenden Arbeit ist die Substanz Dexniguldipin ein potenter Resistenzmodulator in MDR-Zellen, der zur Überwindung der MDR eingesetzt werden kann. Weitere Studien müssen zeigen, ob diese Substanz auch klinisch erfolgreich einzusetzen ist.

6. Literaturverzeichnis

Akayama S, Chen ZS, Kitazono M, Sumizawa T, Furukawa T, Aikou T (1999) Mechanisms for resistance to anticancer agents and the reversal of the resistance. *Hum Cell* 12(3): 95-102

Akimoto H, Bruno NA, Slate DL, Billingham ME, Torti SV, Torti FM (1993) Effect of Verapamil on Doxorubicin cardiotoxicity: altered muscle gene expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Cancer Res* 53: 4658-5664

Albrecht M, Simon WE, Hölzel F (1985) Individual Chemosensitivity of In Vitro Proliferating Mammary and ovarian Carcinoma cells in Comparison to clinical results of chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 109: 210-216

Arps H, Bals U, Gerding D, Trapp M, Niendorf A, Garbrecht M, Klapdor R, Hölzel F, Dietel M (1987) In vitro test for chemosensitivity using freshly explanted tumor cells. *Int J Immunother* 3: 229-235

Arps H (1988) Maligne humane Tumoren in der Zellkultur. Habilitationsschrift, Universität Hamburg

Axiotis CA, Monteagudo C, Merino MJ, La Porte N, Neumann RD (1991) Immunohistochemical detection of P-Glycoprotein in Endometrial adenocarcinoma. *Am J Pathol* 138: 799-806

Barrand MA, Rhodes T, Center MS, Twentyman PR (1993) Chemosensitisation and drug accumulation effects of cyclosporin A, PSC-833 and Verapamil in human MDR large cell lung cancer cells expressing a 190K membrane protein distinct from P-Glycoprotein. *Eur J Cancer Res Clin Oncol* 29: 408-415

Beck WT (1990) Multidrug resistance and its circumvention. *Eur J Cancer Res Clin Oncol* 26: 513-515

Beck WT (1991) Do Anti P-Glycoprotein Antibodies have a Future in the Circumvention of Multidrug Resistance. *J Nat Cancer Inst* 83: 1364-1366

Bellamy WT, Dalton WS, Kailey JM, Gleason MC, McCloskey TM, Dorr RT, Alberts DS (1988) Verapamil reversal of doxorubicin resistance in multidrug resistant human myeloma cells and association with drug accumulation and DNA damage. *Cancer Res* 48: 6303-6308

Bellamy WT, Dalton WS, Dorr RT (1990) The Clinical Relevance of Multidrug Resistance. *Cancer Invest* 8: 545-560

Belz GG, Bliesath H, Essig J, Neumann N, Zech K, Wurst W (1992) Differential effects of two dihydropyridine calcium antagonists in humans. *Clin Pharmacol Ther* 52: 68-79

Bosanquet AG (1985) Stability of solutions of antineoplastic agents during preparation and storage for in vitro assays. *Cancer Chemother Pharmacol* 14: 83-95

Boutonnat J, Bonnefoix T, Mousseau M, Seigneurin D, Ronot X (1998) Coexpression of multidrug resistance involve proteins: a flow cytometric analysis. *Anticancer Res Jul-Aug;18 (4C):* 2993- 2999

Bradley G, Naik M, Ling V (1989) P-Glycoprotein Expression in Multidrug-resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res* 49: 2790-2796

Brophy NA, Marie JP, Rojas VA, Warnke RA, McFall PJ, Smith SD, Sikic BI (1994) MDR1 gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemias and lymphomas: a critical evaluation by four techniques. *Leukemia Res* 8: 327-335

Broxterman HJ, Pinedo HM, Kuiper CM, van der Hoeven JJM, de Lange P, Quak JJ, Scheper RJ, Keizer HG, Schuurhuis GJ, Lankelma J (1989) Immunohistochemical detection of P-Glycoprotein in Human tumor cells with a low degree of drug resistance. *Int J Cancer* 43: 340-343

Broxtermann HJ, Schuurhuis GJ (1997) Transport proteins in drug resistance: detection and prognostic significance in acute myeloid leukemia. *Intern Med Suppl* 740: 147-151

Cass CE, Janowska-Wieczorek A, Lynch MA, Sheinin H, Hindenburg AA, Beck WT (1989) Effect of duration of exposure to Verapamil on Vincristine Activity against Multidrug-resistant human leucemic cell lines. *Cancer Res* 49: 5798-5804

Chabner BA (1982) *Pharmacologic principles of cancer treatment*. W.B.Saunders (Philadelphia) 1-457

Chabner BA, Wilson W (1991) Reversal of Multidrug Resistance. *J Clin Oncol* 9: 4-6

Chan HS, Thormer PS, Haddad G, Ling V (1990) Immunohistochemical detection of P-Glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol* 8: 689-704

Chan HS, Haddad G, Thormer PS, DeBoer G, Lin YP, Ondrusek N, Yeger H, Ling V (1991) P-Glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N Engl J Med* 325: 1608-14

Chan HS, Tohrner PS, Haddad G, Gallie BL (1991) Multidrug resistance phenotype in retinoblastoma correlates with P-Glycoprotein expression. *Ophthalmology* 98: 1425-31

Coppes M, Byard R, Stringer D, Mclorie G, Silver M, Solh H (1991) T-Cell Lymphoma and mature nephroblastoma after synchronous bilateral wilms tumor. *Cancer* 15: 337-341

CordonCardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR (1990) Expression of the Multidrug Resistance Gene Product (P-Glycoprotein) in human Normal and Tumor Tissues. *J Histochem Cytochem* 9: 1277-1287

Cumber PM, Jacobs A, Hoy T, Fisher J, Whittaker JA, Tsuruo T, Padua RA (1990) Expression of the multiple drug resistance gene (mdr-1) and epitope masking in chronic lymphatic leukaemia. *Br J Haematol* 76: 226-230

Cumber PM, Jacobs A, Hoy T, Whittaker JA, Tsuruo T, Padua RA (1991) Increased drug accumulation ex vivo with cyclosporin in chronic lymphatic leukemia and its relationship to epitope masking of P-Glycoprotein. *Leukemia* 5: 1050-1053

Dalton WS, Grogan TM, Meltzer PS, Scheper RJ, Durie BG, Taylor CW, Miller TP, Salmon SE (1989) Drug-Resistance in Multiple Myeloma and Non-Hodgkins Lymphoma: Detection of P-Glycoprotein and Potential Circumvention by Addition of Verapamil to Chemotherapy. *J Clin Oncol* 7: 415-424

Dalton WS, Grogan TM (1991) Does P-Glycoprotein predict response to chemotherapy, and if so, is there a reliable way to detect it. *J Nat Cancer Inst* 83:

Dietel M, Arps H, Lage H, Niendorf A (1990) Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer Res* 50: 6100-6106

Dietel M (1991) What's new in Cytostatic Drug Resistance and Pathology. *Pathol Res Pract* 892-905

Dietel M, Herzig I, Reymann A, Brandt I, Schaefer B, Bunge A, Heidebrecht HJ, Seidel A (1994) Secondary combined resistance to the multidrug-resistance reversing activity of cyclosporin A in the cell line F4/6RADR-CsA. *J Cancer Res Clin Oncol* 120: 263-271

Dietel M, Boss H, Reymann A, Pest S, Seidel A (1996) In vivo reversibility of multidrug resistance by the MDR-modulator dextiguldipine (niguldipine derivative B859-35) and by verapamil. *Exp Ther Oncol* 1(1): 23-29

Dittrich C (1987) Klonieren von soliden Tumoren. Springer (Wien-New York) 1-171

Edens LH (1994) Messungen zur Pharmakokinetik von Doxorubicin und Daunorubicin an Murinen Leukämiezellen vom Multidrug-Resistance Phänotyp und dem sensitiven Vorläuferklon mit einer Silikonölfiltrationsmethode. Dissertationsschrift, Universität Hamburg

Efferth T, Volm M (1993) Reversal of doxorubicin-resistance in sarcoma 1801 tumor cells by inhibition of different resistance mechanisms. *Cancer Lett* 70: 197-202

Endicott JA, Ling V (1989) The biochemistry of P-Glycoprotein-mediated Multidrug Resistance. *Annu Rev Biochem* 58: 137-171

Evans AE, Norkool P, Evans I, Breslow N, D'Angio G (1991) Late Effects of treatment for Wilms`tumor. *Cancer* 67: 331-336

Ferry D, Boer R, Callaghan R, Ulrich WR (2000) Localization of the 1,4-dihydropyridine drug acceptor of P-glycoprotein to a cytoplasmic domain using a permanently charged derivative N-methyl dextrin-glycyl-L-proline. *Int J Clin Pharmacol Ther* 38(3): 130-140

Finstad CL, Yin BWT, Gordon CM, Federici MG, Welt S, Lloyd KO (1991) Some monoclonal antibody reagents (C219 and JSB1) to P-Glycoprotein contain antibodies to blood group A Carbohydrate determinants: A problem of quality Control for Immunohistochemical Analysis. *J Histochem Cytochem* 39: 1603-1610

Friche E, Skovsgaard T, Dano K (1989) Multidrug Resistance: Drug Extrusion and its Counteraction by Chemotherapeutics. *Eur J Haematol* 42: 59-67

Fuchs B, Ostmeier H, Suter L (1991) P-Glycoprotein Expression in malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 117: 168-171

Gekeler V, Boer R, Uberall F, Ise w, Schubert C, Utz I, Hofmann J, Sanders KH, Schachtele C, Klemm K, Grunicke H (1996) Effects of the selective bisindolylmaleimide protein kinase C inhibitor GF 109203X on P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Br J Cancer* 74(6):897-905

Goasguen JE, Dossot JM, Fardel O, Le-Mee F, Le-Gall E, Leblay R, Leprise PY, Chaperon J, Fouchet R (1993) Expression of the multidrug-resistance-associated P-Glycoprotein (P170) in 59 cases of de novo acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. *Blood* 81: 2394-2398

Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM, Lieber M, Cossman J, Gottesman MM, Pastan I (1989) Expression of a Multidrug-resistance gene in human cancers. *J Nat Cancer Inst* 81: 116-124

Gottesman MM, Pastan I (1988) Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Trends Pharmacol Sci* 9: 54-58

Gutjahr P, Schwenger M, Spaar HJ, Michaelis J, Niethammer D, Jürgens H, Kohl J, Ludwig R, Kutzner J, Schmidt D, Hohenfellner R (1990) Bedeutung der präoperativen Chemotherapie und der Radiotherapie bei 373 Kindern mit Wilms Tumor. *Dtsch Med Wschr* 115: 248-253

Haak HR, van Seters AP, Molenaar AJ, Fleuren GJ (1993) Expression of P-Glycoprotein in relation to clinical manifestation, treatment and prognosis of adrenocortical cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 29: 1036-1038

Hart SM, Ganeshaguru K, Lyttelton MP, Prentice HG, Hoffbrand AV, Mehta AB (1993) Flow cytometric assessment of multidrug resistance (MDR) phenotype in acute myeloid leukaemia. *Leukaemia* 11: 239-248

Haskell CM (1985) *Cancer treatment*. W.B.Saunders (Philadelphia) 2nd Ed. 1-1025

Hill BT, Hosking LK (1994) Differential effectiveness of a range of novel drug resistance modulators, relative to verapamil, in influencing vinblastine or teniposide cytotoxicity in human lymphoblastoid CCRF-CEM sublines expressing classic or atypical multidrug resistance. *Cancer Chemother Pharmacol* 33(4): 317-324

Hofmann J, Ueberall F, Egle A, Grunicke H (1991) B-859-35, a new drug with anti tumor activity reverses multi drug resistance. *Int J Cancer* 47: 870-4

Hofmann J, Wolf A, Spitaler M, Bock G, Drach J, Ludescher C, Grunicke H (1992) Reversal of multidrug resistance by B859-35, a metabolite of B859-35, nifedipine, Verapamil and nitrendipine. *J Cancer Res Clin Oncol* 118: 361-366

Hofmann J, Gekeler V, Ise W, Noller A, Mitterdorfer J, Hofer S, Utz I, Gotwald M, Boer R, Glosmann H, et al (1995) Mechanism of action of dexniguldipine-HCL (B8509-035), a new potent modulator of multidrug resistance. *Biochem Pharmacol* 49(5): 603-609

Jensen PB, Christensen IJ, Sehested M, Hansen HH, Vindelov L (1993) Differential cytotoxicity of 19 anticancer agents in wild type and etoposide resistant small cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 67: 311-320

Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem Biophys Acta* 455: 152-162

Karck U, Rathgeb F, Wurst W, Meerpohl HG (1992) Open phase II Study of standard FEC therapy with B8509-35, a novel drug blocking the p 170. 7th NCI EORTC Symposium, Amsterdam

Karcz S, Cowman AF (1991) Similarities and differences between the Multidrug Resistance Phenotype of Mammalian Tumor Cells and Chloroquin Resistance in *Plasmodium Falciparum*. *Exp Parasitol* 73: 233-240

Kartner N, Ling V (1989) Multidrug Resistance in Cancer. *Sci Am* 26-33

Keizer HG, Schuurhuis GJ, Broxterman HJ, Lankelma J, Schoonen WG, van Rijn J, Pinedo HM, Joenje H (1989) Correlation of Multidrug-Resistance with decreased drug accumulation, altered subcellular drug distribution and increased P-Glycoprotein Expression in Cultured SW-1573 Human Lung tumor cells. *Cancer Res* 49: 2988-2993

Kessel D, Botterill V, Wodinsky I (1968) Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. *Cancer Res* 28: 938-941

Kovalic JJ, Thomas P, Beckwith JB, Heusner JH, Norkool PA (1991) Hepatocellular carcinoma as second malignant neoplasms in successfully treated Wilm's tumor patients. *Cancer* 67: 342-344

Kuroda H, Sugimoto T, Ueda K, Tsuchida S, Horii Y, Inazawa J, Sato K, Sawada T (1991) Different Drug sensitivity in two neuroblastoma cell lines established from the same patient before and after chemotherapy. *Int J Cancer* 47: 732-737

Laurencot CM, Scheffer GL, Scheper RJ, Shoemaker RH (1997) Increased LRP mRNA expression is associated with the MDR phenotype in intrinsically resistant human cancer cell lines. *Int J Cancer* 72(6): 1021-1026

Lehne G, Morkrid L, den Boer M, Rugstad HE (2000) Diverse effects of P-glycoprotein inhibitory agents on human leukemia cells expressing the multidrug resistance protein (MRP). *Int J Clin Pharmacol Ther* 38(4): 187-195

Lehnert M (1994) Reversal of P-Glycoprotein-Associated Multidrug Resistance: from Bench to Bedside. *Onkologie* 17: 8-15

Ludescher C, Eisterer W, Hilbe W, Hofmann J, Thaler J (1995) Decreased potency of MDR-modulators under serum conditions determined by a functional assay. *Br J Haematol* 91(3): 652-657

Lum BL, Gosland MP, Kaubisch S, Sikic BI (1993) Molecular targets in oncology: Implications of the Multidrug-resistance Gene. *Pharmacotherapy* 13: 88-109

Ma DF, Bell DR (1989) Multidrug resistance and P-Glycoprotein Expression in Human Cancer. *Austr NZ J Med* 19: 736-74

Marie JP, Zittoun R, Sikic BI (1991) Multidrug resistance (mdr1) Gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood* 78: 586-592

Marie JP, Faussat-Suberville AM, Zhou D, Zittoun R (1993) Daunorubicin uptake by leukemic cells: correlations with treatment outcome and mdr-1 expression. *Leukemia Res* 7: 825-831

Marsh W, Center MS (1987) Adriamycin resistance in HL60 cells and accompanying modification of a surface membrane protein contained in drug-sensitive cells. *Cancer Res* 47: 5080-5086

Mattern J, Volm M (1989) P-Glykoprotein als Resistenz-Marker in Tumoren. *Dtsch Med Wschr* 114: 1979-1981

Meyers MB, Rittmann-Grauer L, O'Brien JP, Safa AR (1989) Characterization of monoclonal antibodies recognizing a M 180,000 P-Glycoprotein: differential expression of the M 180,000 and M 170,000 P-Glycoproteins in Multidrug-resistant human tumor cells. *Cancer Res* 49: 3209-3214

Michieli M, Damiani D, Ermacora A, Masolini P, Raspadori D, Visani G, Scheper RJ, Baccarani M (1999) P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance associated protein in de novo acute non-lymphocytic leukemias: biological and clinical implications. *Br J Haematol* 104(2): 328-335

Michieli M, Damiani D, Ermacora A, Geromin A, Michelutti A, Masolini P, Baccarani M (2000) P-Glycoprotein (PGP), lung-resistance-related protein (LRP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) expression in acute promyelocytic leukemia. *Br J Haematol* 108(4): 703-709

Miller TP, Grogan TM, Dalton WS, Spier CM, Scheper RJ, Salmon SE (1991) P-Glycoprotein Expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy and high dose verapamil. *J Clin Oncol* 9: 17-24

Moins N, Cayre A, Chevillard S, Maublant J, Verelle P, Finat-Duclos F (2000) Effects of MDR reversing agent combinations on the 3H-daunomycin accumulation in drug-sensitive and drug-resistant human cancer cells. *Anticancer Res* 20(4): 2617-2623

Naito S, Sakamoto N, Kotoh S, Goto K, Matsumoto T, Kumazawa J (1993) expression of P-Glycoprotein and multidrug resistance in renal cell carcinoma. *Eur Urology* 24: 156-160

Neumann M, Wilisch A, Diddens H, Probst H, Gekeler V (1992) MDR hamster cells exhibiting multiple altered gene expression: effects of dexniguldipine-HCL (B859-35), cyclosporin A, and buthionine sulfoximine. *Anticancer Res* 12: 2297-2302

Niessen KH (1989) Pädiatrie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

Nishiyama K, Shirahama T, Yoshimura A, Sumizawa T, Furukawa T, Ichikawa-Haraguchi M, Akiyama S, Ohi Y (1993) Expression of the multidrug-transporter, P-Glycoprotein, in renal and transitional cell carcinomas. *Cancer* 71: 3611-3619

Nuessler V, Scheulen ME, Oberneder R, Kriegmair M, Goebel KJ, Rathgeb F, Wurst W, Zech K, Wilmanns W (1997) Phase 1 and pharmacokinetic study of the P-glycoprotein modulator dexniguldipine-HCL. *Eur J Med Res* 2(2): 55-61

Pavelic ZP, Reising J, Pavelic L, Kelley DJ, Stambrook PJ, Gluckman JL (1993) Detection of P-Glycoprotein with four monoclonal antibodies in normal and tumor tissues. *Arch Otolaryngol* 119: 753-757

Pileri SA, Sabattini E, Falini B, Tazzari PL, Gherlinzoni F, Michieli MG, Damiani D, Zucchini L, Gobbi M, Tsuruo T, Baccarani M (1991) Immunohistochemical detection of the multidrug transport protein P170 in human normal tissues and malignant lymphomas. *Histopathology* 19: 131-140

Plouzek CA, Ciolino HP, Clarke R, Yeh GC (1999) Inhibition of P-glycoprotein activity and reversal of multidrug resistance in vitro by rosemary extract. *Eur J Cancer* 35(10): 1541-1545

Raderer M, Scheithauer W (1993) Clinical trials of agents that reverse Multidrug-Resistance. A literature review. *Cancer* 72: 3553-3563

Reymann A, Woermann C (1989) In vitro study on physiological membrane transport and diffusional properties in multidrug-resistant mouse Friend erythroleukemia cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 339: R42

Reymann A, Edens L, Erb N, Erttmann R, Looft G, Woermann C (1989) Steady state kinetics of anthracycline uptake in mouse Friend erythroleukemia cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 340: R78

Reymann A, Woermann C, Dietel M (1991) Reversal of anthracycline accumulation deficits in multidrug resistant Friend leukemia cells by the dihydropyridine B859-35, the R-enantiomer of nifedipine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 343: R50

Reymann A, Dietel M, Erttmann R (1993) Reversal of multidrug resistance in friend leukaemia cells by dexnifedipin-hcl. *Cancer Chemother Pharmacol* 32: 25-30

Reymann A, Bunge A, Laer S, Dietel M (1996) Morphological and functional features of cytostatic drug resistance and the effects of MDR modulators. *Pharmazie* 51(3): 171-176

Reymann A, Woermann C, Froschle G, Schneider C, Brasen JH, Lage H, Dietel M (1998) Sensitive assessment of cytostatic drug resistance-mediating factors MDR1 and MRP in tumors of the gastrointestinal tract by RT-PCR. *Int J Clin Pharmacol Ther* 36(1): 55-57

Ro J, Sahin A, Ro JY, Fritsche H, Hortobagyi G, Blick M (1990) Immunohistochemical analysis of P-Glycoprotein expression correlated with chemotherapy resistance in locally advanced Breast cancer. *Hum Pathol* 21: 787-791

Roller E, Klumpp B, Krause J, Eichelbaum M, Schumacher K (1993) Influence of sequential exposure to R-Verapamil or B8509-035 on Rhodamin 123 accumulation in human lymphoblastoid cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 32: 151-155

Ross DD, Wooten PJ, Sridhara R, Ordonez JV, Lee EJ, Schiffer CA (1993) Enhancement of Daunorubicin accumulation, retention and cytotoxicity by Verapamil or cyclosporin A in blast cells from patients with previously untreated acute myeloid leukemia. *Blood* 82: 1288-1299

Ross DD (2000) Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia* 14(3): 467-473

Rothenberg M, Ling V (1989) Multidrug resistance: Molecular Biology and clinical relevance. *J Nat Cancer Inst* 81: 907-910

Salmon SE, Dalton WS, Grogan TM, Plezia P, Lehnert M, Roe DJ, Miller TP (1991) Multidrug resistant myeloma: laboratory and clinical effects of Verapamil as a chemosensitizer. *Blood* 78: 44-50

Sanfilippo O, Ronchi E, De Marco C, Di Fronzo G, Silvestrini R (1991) Expression of P-Glycoprotein in Breast cancer tissue and in vitro resistance to Doxorubicin and Vincristin. *Eur J Cancer Clin Oncol* 27: 155-158

Schaefer A, Westendorf J, Reymann A, Lingelbach K, Schmidt C, Mihalache DL, Marquardt H (1993) Decreased resistance to N,N dimethylated anthracyclines in multidrug-resistant Friend erythroleukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 31: 301-307

Scheper RJ, Bulte JW, Brakkee JG, Quak JJ, Van der Schott E, Balm AJ, Meuer CJ, Broxterman HJ, Kuiper CM, Lankelma J, Pinedo HM (1988) Monoclonal antibody JSB-1 detects a highly conserved epitope on the P-Glycoprotein associated with Multi-Drug-Resistance. *Int J Cancer* 42: 389-394

Schott B, Londos-Gagliardi D, Ries C, Huet S, Robert J (1993) Pharmacological and molecular characterization of intrinsic and acquired doxorubicin resistance in murine tumor cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 119: 527-532

Schuller HM, Correa E, Orloff M, Reznik GK (1990) Successful chemotherapy of experimental neuroendocrine lung tumors in hamsters with an antagonist of Ca⁺⁺/calmodulin. *Cancer Res* 50: 1645-49

Schuller HM, Orloff M, Reznik GK (1994) Inhibition of protein-Kinase-C-dependent cell proliferation of human lung cancer cell lines by the dihydropyridine dexniguldipine. *J Cancer Res Clin Oncol* 120: 354-358

Segawa Y, Ohnoshi T, Hiraki S, Ueoka H, Kiura K, Kamei H, Tabata M, Shibayama T, Miyatake K, Genba K, et al. (1993) Immunohistochemical detection of P-Glycoprotein and carcinoembryonic antigen in small cell lung cancer: with reference to predictability of response to chemotherapy. *Acta Med Okayama* 47: 181-189

Shah A, Gaveriya H, Motohashi N, Kawase M, Saito S, Sakagami H, Satoh K, Tada Y, Solymosi A, Walfard K, Molnar J (2000) 3,5-diacetyl-1,4-dihydropyridines: Synthesis and MDR reversal in tumor cells. *Anticancer Res* 20(1A): 373-377

Stein U, Walther W, Lemm N, Naundorf H, Fichtner I (1997) Development and characterization of novel human multidrug resistant mammary carcinoma lines in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 72(5): 885-891

Steinhoff A, Boetefür A, Looft G, Erttmann R (1989) Immunocytochemical detection of P-170 Glycoprotein in multiple-drug-resistant and superresistant mouse leukemia cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 340: R29

Tiirikainen MI, Elonen E, Ruutu T, Jansson SE, Krusius T (1993) Clinical significance of P-Glycoprotein expression in acute leukaemia as analysed by immunocytochemistry. *Eur J Haematol* 50: 279-285

Toth K, Vaughan MM, Slocum HK, Arredondo MA, Takita H, Baker RM, Rustum YM (1994) New immunohistochemical "sandwich" staining method for mdr-1 P-Glycoprotein detection with JSB-1 monoclonal antibody in formalin-fixed, paraffin-embedded human tissues. *Am J Pathol* 144: 227-236

Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, et al. (1981) Overcoming of Vincristine resistance in P 388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 41: 1967-1972

Van de Vrie W, Schellens JH, Loss WJ, Kolker HJ, Verwey J, Stoter G, Durante NM, Eggermont Am (1996) Modulation of multidrug resistance with dexniguldipine hydrochloride (B8509-035) in the CC 531 rat colon carcinoma model. *J Cancer Res Clin Oncol* 122(7): 403-408

Volm M, Bak M, Efferth T, Lathan B, Mattern J (1988) Immunocytochemical detection of a resistance associated glykoprotein in tissue culture cells, ascites tumors and human tumor xenografts by mab 265/F4. *Anticancer Res* 8: 531-536

- Volm M, Bak M, Efferth T, Mattern J (1988) Induced multidrug resistance in murine Sarcoma 180 cells grown in Vitro and in Vivo and associated changes in expression of multidrug resistance DNA-Sequences and Membrane Glycoproteins. *Anticancer Res* 8: 1169-1178
- Volm M, Bak M, Efferth T, Mattern J (1989) Induced multidrug resistance in murine leukemia L1210 and associated changes in a surface-membrane glycoprotein. *J Cancer Res Clin Oncol* 115: 17-24
- Volm M, Efferth T, Bak M, Ho AD, Mattern J (1989) Detection of the multidrug-resitant phenotype in human tumors by monoclonal antibodies and the streptavidin-biotinylated phycoeritrin complex method. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25: 743-749
- Wall DM, Sparrow R, Hu XF, Nadalin G, Zalcborg JR, Marschner IC, van der Weiden M, Parkin JD (1993) Clinical application of a rapid, functional assay for multidrug resistance based on accumulation of the fluorescent dye, fluo-3. *Eur J Cancer Res Clin Oncol* 29: 1024-1027
- Weinstein RS, Coon JS (1990) Laboratory asesment of P-Glycoprotein in cancer chemosensitivity testing. *Human Pathol* 21: 785-786
- Weinstein RS, Kuszak JR, Kluskens LF, Coon JS (1990) P-Glycoproteins in Pathology: The multidrug resistance gene family in humans. *Human Pathol* 21: 34-48
- Werdan K, Lehner K, Cremer T, Stevenson A, Messerschmidt O (1980) D-Glucose transport into suspended human fibroblasts. Rapid measurement of uptake by silicon oil filtration centrifugation, and comparison of different cell detachment procedures. *Hoppe Seyler`s Z Physiol Chem* 361: 91-104
- Wigler PW (1999) PSC 833, cyclosporin A, and dexniguldipine effects on cellular calcein retention and inhibition of the multidrug resistance pump in human leukemic lymphoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 257(2): 410-413
- Willingham MC, Richert ND, Cornwell MM, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I (1987) Immunocytochemical localization of P170 at the plasma Membrane of multidrug resistant human cells. *J Histochem Cytochem* 35: 1451-1456
- Wilson WH, Bryant G, Bates S, Fojo A, Wittes RE, Steinberg SM, Kohler DR, Jaffe ES, Herdt J, Cheson BD (1993) EPOCH chemotherapy: toxicity and efficacy in relapsed and refractory non-Hodgkin`s lymphoma. *J Clin Oncol* 11: 1573-1582

Wössner R, Toomes H, Fritz P, Linder A, Dierkesmann RE, Behrle E, Wicherek C (1994) Immunohistochemical demonstration of Glycoprotein 170 and Gluthathione S Transferase Isoenzymes in normal and neoplastic bronchial tissue. *Onkologie* 17: 28-34

Wolf DC, Horwitz SB (1992) P-Glycoprotein transports corticosterone and is photoaffinity-labeled by the steroid. *Int J Cancer* 52: 141-146

Wolf M, Lenze H, Schroeder M, Maasberg M, Wurst W, Rathgeb F, Havemann K (1991) Application of the dihydropyridine derivate B 8509-35 in resistant small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 27 (Suppl 2): R1128

Yusa K, Tsuruo T (1989) Reversal Mechanism of Multidrug Resistance by Verapamil: Direct Binding of Verapamil to P-Glycoprotein on Specific Sites and Transport of Verapamil outward across the Plasma Membrane of K 562/ADM Cells. *Cancer Res* 49: 5002-5006

Yokoyama Y, Sato S, Fukushi Y, Sakamoto T, Futagami M, Saito Y (1999) Significance of multi-drug-resistant proteins in predicting chemotherapy response and prognosis in epithelial ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol Res* 25(6): 387-394

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. H. Arps danke ich für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und die freundliche Aufnahme im Institut für Pathologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf.

Herrn Professor Dr. med. Helmchen und Herrn Professor Dr. med. Scholz danke ich für die Möglichkeit, meine Untersuchungen in Ihren Instituten durchführen zu dürfen.

Herrn Professor Dr. med. A. Reymann danke ich für die Möglichkeit, einen Teil der vorliegenden Untersuchungen in seinem Labor durchführen zu können, sowie die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Institut für Pharmakologie.

Herrn Professor Dr. med. Schaefer, Abteilung für Allgemeine Toxikologie der Universität Eppendorf, danke ich für die Überlassung der F4/6 Zelllinien.

Herrn Professor Dr. med. Winkler, Herrn Professor Dr. med. Erttmann, sowie Herrn Professor Dr. med. Henze (Berlin) danke ich für die Möglichkeit, die klinischen Daten der betroffenen Patienten auswerten zu können.

Herrn Professor Dr. V. Ling, Ontario, danke ich für die Überlassung eines von ihm generierten monoklonalen Antikörpers für meine Untersuchungen.

Außerdem gilt mein Dank Frau S. Schmidt, Frau C. Woermann und Frau N. Gürses für die Unterstützung während meiner Arbeit, sowie Herrn Dr. med. H.-J. Lorenz für die Unterstützung bei der Einreichung.

Lebenslauf

Name: Klaus-Martin Kogelmann

Geburtsdatum/-ort: 01. Mai 1965 in Hannover

Nationalität/
Familienstand: deutsch/ geschieden, 2 Kinder

Schule: 1971 - 1975 Volksschule Herrentor, 26725 Emden
1975 - 1977 Orientierungstufe Wallschule, 26721 Emden
1978 - 1984 Johannes Althusius Gymnasium, 26721 Emden
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst: 1984 - 1986 DRK Emden, Rettungsdienst

Berufstätigkeit: 1986 - 1989 Verein f. Rettungsdienst RKsH Emden
1989 Erlangung der Berufsbezeichnung Rettungsassistent

Studium: 1989 - 1995 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg

Ausbildung: Januar 1996 bis April 1997, Abteilung für Anästhesiologie,
Evangelisches Krankenhaus Oldenburg (Arzt im Praktikum)

Mai 1997 bis Juni 1997, Abteilung für Anästhesiologie,
Borromäus Hospital Leer (Arzt im Praktikum)

1997 - 2002, Abteilung für Anästhesiologie,
Borromäus Hospital Leer (Assistenzarzt, Facharzt)

Facharztprüfung im Gebiet Anästhesiologie am 03.05.2000

Juni 2002 – August 2002, Abteilung für Anästhesiologie,
Marienkrankenhaus Papenburg (Facharzt)

ab September 2002, Abteilung für Anästhesiologie,
Hans-Susemihl-Krankenhaus Emden (Funktionsoberarzt)